

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Techniky asistované reprodukce

bakalářská práce

(rešeršní práce)

Hradec Králové, 2012

Simona Frydrychová

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá problematikou asistované reprodukce. Jednotlivé kapitoly zevrubně popisují techniky, které se v oboru asistované reprodukce běžně užívají. Cílem práce je seznámit čtenáře s hlavní náplní a možnostmi tohoto oboru. Práce je rozdělena do čtyř částí v závislosti na charakteru uvedených technik asistované reprodukce. V práci jsou také zahrnuty statistické aspekty, které umožňují vyjádřit úspěšnost technik asistované reprodukce.

Klíčová slova

Asistovaná reprodukce, vajíčko, spermie, embryo

Abstract

The bachelor thesis concentrates on the issue of assisted reproduction. Each chapter thoroughly describes techniques, which are usually used in the field of assisted reproduction. The aim of this bachelor thesis is to meet readers with the main content and possibilities of the branch. The thesis is divided into four parts according to the character of mentioned techniques of assisted reproduction. The thesis also contains the statistical aspects indicating success of assisted reproduction techniques.

Key words

Assisted reproduction, egg cell, sperm, embryo

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: **Techniky asistované reprodukce** vypracovala samostatně a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 22.4.2012

Simona Frydrychová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem, kteří mi byli nějakým způsobem nápomocni při psaní bakalářské práce. Především bych ráda poděkovala paní doktorce MuDr. Ivě Zadrobílkové z Centra Asistované Reprodukce v Hradci Králové za odborné vedení práce, cenné rady, zkušenosti a připomínky, které mi poskytla během jejího zpracování.

V Hradci Králové dne 22.4.2012

Simona Frydrychová

Obsah

1. Úvod	- 5 -
2. Cíl a zadání bakalářské práce	- 7 -
3. Diagnostické metody	- 8 -
3.1. Andrologické vyšetření	- 8 -
3.2. Embryologické vyšetření	- 12 -
4. Terapeutické metody	- 16 -
4.1. Příprava spermií před použitím pro ART	- 16 -
4.2. Arteficiální inseminace a intrauterinní inseminace	- 20 -
4.3. In vitro fertilizace	- 23 -
4.4. Intracytoplasmatická injekce spermie do vajíčka	- 28 -
4.5. Intracytoplasmatická injekce předem vybrané spermie (PICSI)	- 30 -
4.6. IMSI	- 32 -
4.7. Asistovaný hatching	- 34 -
4.8. PESA, MESA, TESA, TESE a micro-TESE	- 36 -
4.9. Preimplantační genetická diagnostika	- 39 -
5. Kryokonzervační metody	- 42 -
6. Statistické parametry	- 46 -
7. Závěr	- 49 -
8. Seznam použitých zkratk	- 51 -
9. Seznam obrázků a tabulek	- 52 -
10. Seznam použitých zdrojů	- 54 -
11. Seznam příloh	- 65 -

1. Úvod

Pro většinu párů je těhotenství samozřejmou záležitostí, poté co se muž se ženou rozhodnou počít potomka. V některých případech dojde k otěhotnění i bez tohoto rozhodnutí^[1]. Jinak je tomu ovšem u 15 % párů, u nichž i přes velké snahy zůstanou přání počít dítě nevyslyšena. Toto procento odpovídá přibližně každému sedmému páru, který neplodnost postihuje^[2]. Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje neplodnost jako opakované neúspěchy v otěhotnění při pravidelném, nechráněném pohlavním styku po dobu dvanácti měsíců^[3].

Příčin neplodnosti je nespočet, ať už se týkají ženy, muže, nebo obou partnerů. Pokud manželský pár po uběhlé lhůtě jednoho roku i přes veškeré snažení neotěhotní, je vhodné navštívit odborníka. Přistupuje se k vyšetření obou partnerů, aby se zjistila příčina potíží bránících v početí dítěte. Lékař se následně snaží tyto problémy odstranit buď pomocí medikamentů nebo chirurgicky. V některých případech ovšem tyto postupy nelze podstoupit, nebo jsou nedostačující. Poté se přistupuje k metodám asistované reprodukce^[1, 4].

Asistovanou reprodukci rozumíme v širším slova smyslu jakoukoliv manipulaci s pohlavními buňkami za účelem léčby neplodnosti a zvýšení šance na početí. Existuje celá řada postupů využívaných v rámci ART (assisted reproduction techniques)^[5]. Pro lepší přehlednost je lze rozdělit do tří skupin na metody diagnostické, které hodnotí kvalitu zárodečných buněk a fertilizační potenciál jedince, metody terapeutické zahrnující přípravu spermií a konkrétní metody in vitro fertilizace, intrauterinní inseminaci či embryotrasfer, a konečně metody kryokonzervační sloužící k uchovávání pohlavních buněk, zárodečných tkání a embryí.

Ve své bakalářské práci se přednostně zaměřuji na rutinně využívané techniky asistované reprodukce a techniky, které svým objevem v posledních letech výrazně přispěly ke zvýšení šance na početí. Níže pro zajímavost uvádím další techniky, jimž na následujících stránkách již nebude věnována pozornost. Jedná se např. o metodu GIFT - Gamets IntraFallopian Transfer, která spočívá v zavedení spermií a vajíčka do vejcovodu, FREDI – Fallopian

Replacement of Eggs with Delayed Intrauterine Insemination (zavedení vajíčka do vejcovodu a následná inseminace), ZIFT – Zygote IntraFallopian Transfer, která spočívá v zavedení embrya do vejcovodu a VITI- Vaginal IntraTubal Insemination, při níž se spermie zavádí do vejcovodů^[5].

Cílem práce je zasvětit čtenáře do způsobů technik prováděných v rámci asistované reprodukce. Práce mu také ozřejmí, v jakých případech indikovat konkrétní metodu. Závěrečná kapitola poslouží k orientaci, jaké parametry jsou v asistované reprodukci statisticky zpracovávány, a umožní čtenáři přehledně odhalit procentuální úspěšnosti jednotlivých ART metod.

Téma bakalářské práce jsme si zvolila z důvodu zájmu o tuto problematiku. Možnost napomoci vzniku lidského života mě vždy fascinovala. V posledních letech se o této problematice hovoří čím dál častěji. Důvodem je především stále vzrůstající počet neplodných manželských párů. Techniky asistované reprodukce se tak stávají metou budoucnosti.

2. Cíl a zadání bakalářské práce

Bakalářská práce na téma Techniky asistované reprodukce je zpracována formou rešerše na základě znalostí získaných z odborné literatury a stáže v Centru asistované reprodukce v Hradci Králové. Cílem práce je seznámení s problematikou neplodnosti, konkrétně s léčebnými postupy prováděnými v oboru asistované reprodukce. V práci je kladen důraz na popis běžně využívaných technik asistované reprodukce a technik, které svým objevem v posledních letech výrazně přispěly ke zvýšení šance na početí.

3. Diagnostické metody

Diagnostické metody slouží ke zhodnocení kvality zárodečných buněk a fertilizačního potenciálu jedince. Podle typu manipulovaných buněk, tj. mužských či ženských, je lze rozdělit na metody andrologické a embryologické.

3.1. Andrologické vyšetření

Andrologické vyšetření představuje laboratorní analýzu spermatu, která poskytuje základní informace o fertilizačních schopnostech muže. Výsledkem vyšetření je sestavení spermiogramu^[6].

Andrologické laboratoře využívají jako zdroj standardizované metodiky pro vyšetření spermiogramu laboratorní manuál vydávaný Světovou zdravotnickou organizací WHO. První vydání vyšlo v roce 1980. V letech 1987, 1992, 1999 a 2010 byl manuál aktualizován na základě nových poznatků týkajících se této problematiky^[6]. Podkladem pro nejnovější verzi z roku 2010 se stala metaanalytická studie pojmenovaná jako „World Health Organization reference values for human semen characteristics“, která zahrnovala 4500 mužů ze 14 zemí ze 4 různých kontinentů. Výsledkem studií byl fakt, že referenční hodnoty, které byly doposud používány pro hodnocení výsledků spermiogramu, jsou značně nadhodnocené. Z tohoto důvodu došlo k aktualizaci referenčních hodnot^[7].

Pro účely vyšetření spermiogramu je vzorek ejakulátu získán masturbací. Před odběrem je pacient vyzván k několikadenní sexuální abstinenci. WHO manuál udává jako optimum tři až pět dnů. V nejlepším případě dochází k odběru vzorku do širokohrdlé nádoby přímo v laboratoři. Nádoba musí být extrémně čistá od chemikálií a zbytků dezinfekce, které by mohly negativně působit na spermie v ejakulátu. Odběr je možné podstoupit i doma. V takovém případě ale musí být ejakulát dopraven do laboratoře nejdéle do 60 minut, což je maximální časový limit, při němž jsou výsledky vyšetření ještě považovány za relevantní. Během transportu musí být vzorek uchován ve tmě a teplotě blízké teplotě těla. K interpretaci výsledků o stavu ejakulátu pacienta je nutné

provést dvě vyšetření s časovým odstupem nejméně sedmi dnů, ne však více než tři týdny^[6].

Ejakulát se hodnotí v laboratoři jak z makroskopického tak mikroskopického hlediska. Makroskopické hodnocení popisuje zkapalnění, vzhled, objem, konzistenci a pH ejakulátu. Normální vzorek ejakulátu obvykle do 30 minut zkapalní. Pokud ejakulát nezkapalní, přistupuje se k enzymatické digesci, případně je možné napomoci zkapalnění naředěním kultivačním médiem nebo mechanicky opakovaným proplachováním uvnitř pipety. Ve zkapalněném ejakulátu se hodnotí průhlednost vzorku a případné příměsi krve, hlenu nebo hnisu. Podle WHO činí norma pro objem ejakulátu 1,5-5,0 ml. Viskozita se hodnotí nasátím vzorku do 5ml pipety. Z ní by mělo normální sperma samovolně odkapávat po jednotlivých kapičkách. Hodnota pH se vyšetřuje pomocí indikátorových papírků. Normální pH ejakulátu se pohybuje v rozmezí 7,2 až 7,8^[6].

Mikroskopické hodnocení sleduje množství a pohyblivost spermií, morfologii, aglutinaci a přítomnost tzv. kulatých buněk. Při mikroskopování je výhodné využívat podložního sklíčka s počítací komůrkou, která má dané rozměry, díky nimž lze snadno převést počet buněk ve sledovaném množství na celý objem ejakulátu^[8].

Vzorek spermatu sledovaný pod mikroskopem by měl být homogenní. Při nízkých počtech spermií je možné vzorek centrifugovat a až poté stanovit koncentraci. Centrifugací se oddělí sediment od seminální plasmy, jejíž známý objem se následně odstraní. Tím se spermie na dně zkumavky zakoncentrují. Konečná koncentrace spermií se přepočítá na celkový objem centrifugovaného vzorku^[6].

Motilitu spermií laborantka hodnotí nejméně v pěti různých zorných polích mikroskopu. Pohyblivost se sleduje u 200 spermatozoí a je klasifikována do tří skupin dle následujících kritérií:

- 1) Progresivní pohyblivost: Spermie vykazují aktivní pohyb, buď lineární, nebo ve velkých kruzích. WHO manuál z roku 1999 dělí progresivní pohyblivost podle rychlosti. Z důvodu náročného

hodnocení současný manuál upouští od této kategorizace. Pro úplnost ji zde ovšem uvádím.

- Rychlá progresivní pohyblivost. Představuje rychlost $25\mu\text{m/s}$ a více při 37°C nebo $20\mu\text{m/s}$ a více při 20°C .
- Pomalá progresivní pohyblivost. Je označována jako „sluggish“, což v překladu znamená slimák. Rychlost pohybu se pohybuje v rozmezí $5\mu\text{m/s}$ až $20\mu\text{m/s}$.

2) Neprogresivní pohyblivost. Definuje rychlost pohybu menší než $5\mu\text{m/s}$. Spermie vykazují pohyb na místě, v malých kruzích.

3) Nepohyblivé spermie^[9].

V ejakulátu jsou vždy více či méně přítomné kulaté buňky. Tento název je souhrnným označením pro všechny další buněčné elementy vyskytující se v ejakulátu vedle spermatozoí. Kulaté buňky zahrnují epitelální buňky urogenitálního traktu, leukocyty, prostatické buňky či spermatogenní buňky. V normálním ejakulátu se za fyziologických podmínek nevyskytuje více než 5 milionů kulatých buněk na 1 ml ejakulátu. V případě, kdy vzorek obsahuje zvýšené množství leukocytů, poukazuje tento fakt na přítomnost infekce. Nezralé zárodečné buňky jsou známkou poruchy spermatogeneze^[6].

Pod mikroskopem hodnotíme také vitalitu spermií v procentech. Pomocí speciální barvicí techniky se zjišťuje integrita buněčné membrány. Test je založen na faktu, že mrtvé buňky s porušenou membránou dovolují určitým barvivům proniknout do jejich nitra, kdežto živé buňky s neporušenou membránou zůstanou neobarvené^[9].

Hodnocení morfologie spermií je velice obtížná, jelikož tvary, které mohou spermie vykazovat, jsou rozličné. Pro hodnocení se využívá barvených preparátů. Barvením se zviditelní akrozomální a postakrozomální část hlavičky, cytoplazmatická kapka krčku a bičík^[6].

WHO stanovila v roce 2010 spodní referenční limit na 4% normálních forem spermií ve vzorku ejakulátu. Morfologicky normální spermie má oválný tvar hlavičky s hladkými konturami, která je ze 40 až 70% pokryta akrozómem. Střední část spermie by měla být pravidelná a přibližně stejně dlouhá jako

hlavička. Bičík normální spermie je asi 10 krát delší a neměl by se výrazně zahýbat ani být zdvojený^[9].

Ze všech získaných parametrů můžeme stanovit závěr spermiogramu. Spodní referenční limity vyšetřovaných parametrů charakterizujících ejakulát jsou shrnuty v Příloze 1. Následující tabulka 1 uvádí možnosti interpretovaných závěrů v závislosti na výsledcích vyšetření^[10].

Tabulka 1: Výsledky vyšetření spermiogramu

Normospermie	Všechny parametry jsou v normě.
Oligo(zoo)spermie	Celkové množství spermií v ejakulátu je menší než 39 milionů, (koncentrace spermií je menší než 15 mil spermií na 1 ml ejakulátu).
Asthen(zoo)spermie	Procento progresivně pohyblivých buněk je menší než 32 %.
Terato(zoo)spermie	Procento morfologicky normálních spermií je menší než 4 %.
Azoospermie	V ejakulátu nejsou přítomny zralé formy spermií.
Globozoospermie	Spermiím chybí akrozomální části hlavičky, což způsobuje jejich neschopnost proniknout do oocyty.
Hypoospermatus	Objem ejakulátu je snížený (méně než 1,5ml).
Pyospermie	Ve spermatu jsou přítomny bílé krvinky značící probíhající zánět.
Nekrospermie	Přítomnost pouze mrtvých spermií.

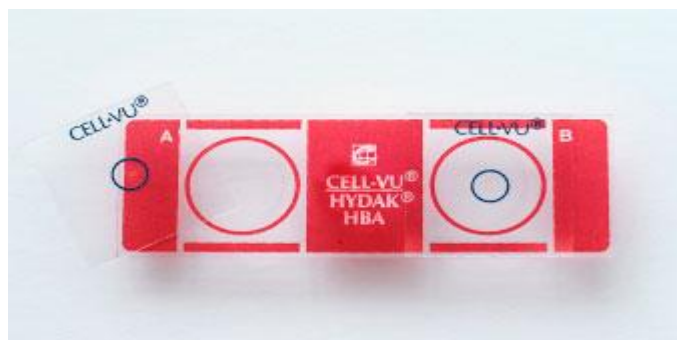
Zdroj: ZADROBÍLKOVÁ, Iva. *Metody asistované reprodukce*. Výuková prezentace. Centrum asistované reprodukce Sanus, Hradec Králové, 2012

Existují i jiné techniky vyšetřování spermií. Jedná se o vyšetření DNA fragmentací pomocí metody Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). Technika spočívá ve zjištění poruchy integrity chromatinu ve smyslu přítomnosti zlomů v DNA a defektní kondenzace jádra spermie. Výsledek vyšetření je vyjádřen jako DNA fragmentační index (DFI), který značí populaci spermií s narušenou integritou chromatinu. Podle hodnoty získaného DFI se rozlišují následující případy. Nízký DNA fragmentační index do 15% značí vysoký fertilizační potenciál. DFI v rozmezí hodnot 16-25% odpovídá střednímu fertilizačnímu potenciálu. DFI vyšší než 26% svědčí o velmi nízké fertilizační schopnosti spermií^[11]. K vyšetření se používá průtokový cytometr, jehož podstatou je postupný průchod jednotlivých pohlavních buněk obarvených fluorescenčním barvivem průtokovou celou, kam je vyslán laserový paprsek^[12].

Druhou technikou umožňující zhodnocení spermií je HBA vyšetření neboli Sperm-Hyaluronan Binding Assay. Vyšetření je založeno na schopnosti zralé spermie vázat se pomocí exprimovaného receptoru na hyaluronan, hlavní mukopolysacharid obalu vajíčka. Nezralé spermie tuto schopnost nemají^[13]. Test se provádí za použití komerčně dostupných podložních sklíček potažených hyaluronanovou vrstvou, na něž se umístí vzorek spermatu. Zralé spermie se hlavičkou přichytí k hyaluronanu a vykazují neprogresivní pohyb na místě svým bičíkem. Nezralé spermie si zachovávají progresivní pohyb. Vzorek necháme zhruba 15 minut inkubovat, poté počítáme podíl navázaných spermií ze 400 hodnocených spermií^[14].

HBA skóre dosahuje hodnot vyšších nebo rovno 80%. Nižší HBA vypovídá o abnormálním zastoupení nezralých spermií a tudíž nižší fertilizační schopnosti u vyšetřovaného muže. Příklad komerční HBA soupravy je vyobrazen níže na obrázku 1^[10].

Obrázek 1: Souprava pro HBA test



Zdroj: <http://www.ivf1.com/hyaluronan-binding-assay/>, [online: 20.3.2012]

3.2. Embryologické vyšetření

Princip embryologického vyšetření spočívá v hodnocení kvality jednotlivých embryí získaných metodou mimotělního oplodnění. Jejich kvalita se liší v závislosti na přítomných buněčných fragmentech nebo různě velkých blastomer^[15]. Buněčné fragmenty představují membránou ohraničené komponenty, které obsahují buněčnou cytoplazmu, avšak nikoliv DNA^[16]. Přítomné fragmenty pravděpodobně snižují objem cytoplazmy pro buněčné dělení, což může vést až k eliminaci počtu blastomer v embryu, nebo změně jejich velikosti. Zvýšený počet fragmentů může ovlivnit i proces kompaktace tím,

že činí kontakty buněk obtížnější. Dlouhá doba mezi mitózami také přispívá ke zhoršení kvality embryí^[15].

Embrya lze hodnotit jak v raném stádiu, tj. 2-3 dny po oplození, nebo embrya ve stádiu moruly čtvrtý den po oplození. Hodnotí se i blastocysty v rámci prodloužené kultivace pátý nebo šestý den po oplození vajíčka spermií^[17].

V současné době se pro hodnocení dvou či třídenních embryí upřednostňuje skórovací systém, který byl vytvořen odborníky na Cornellské univerzitě^[17]. Tento systém spočívá v hodnocení morfologie tzv. preembryí a jejich následného roztřídění do 5 možných skupin tzv. „grade“ podle stupně fragmentace a velikosti blastomer. Grade 1 představuje skupinu embryí se stejně velkými blastomerami. Není přítomná žádná buněčná fragmentace. Grade 2 zahrnuje embrya se stejně velkými blastomerami a současně buněčnými fragmenty nepřesahující hodnotu 15% celkové plochy embrya. Do třídy Grade 3 jsou řazena ta embrya, jejichž blastomery se výrazně liší ve velikosti, a obsahují různé buněčné fragmenty. Embrya v Grade 4 jsou tvořena stejně velkými nebo různými blastomerami a vykazují výraznější buněčnou fragmentaci, větší než 20% plochy embrya. Grade 5 představuje případ, kdy je embryo tvořeno převážně fragmenty, které tvoří až 50% embrya, často i více. V závislosti na masivní fragmentaci dochází k potlačení počtu blastomer a jejich různorodé velikosti^[17]. Na následujícím obrázku 2 je pro představu uveden příklad embrya tvořeného osmi blastomerami.

Obrázek 2: Embryo ve stádiu osmibuněčného vývoje



Zdroj: <http://www.embryology.ch/francais/evorimplantation/furchung01.html>,

[21.3.2012]

Hodnocení morfologie embryí ve stádiu moruly je využíváno v menší míře. Čtvrtý den po oplození se pozoruje nejdříve stupeň kompaktnosti moruly. U počáteční moruly jsou ještě viditelné blastomery, které se postupně začínají formovat do souvislé buněčné hmoty. Plně kompaktní morula, k vidění na následujícím obrázku 3, je tvořena blastomerami, které jsou k sobě těsně přilnuty a jejich membrány nejsou patrné. V případě, kdy embryo čtvrtý den po oplození nevykazuje žádné známky kompaktnosti, do dalšího hodnocení ho nezařazujeme. U kompaktních morul dále sledujeme podíl blastomer, morfologii a podíl buněčných fragmentů^[17].

Obrázek 3: Embryo ve stádiu moruly



Zdroj: <http://www.embryology.ch/francais/evorimplantation/furchung01.html>,
[online: 21.3.2012]

Blastocysta se vyvíjí pátý a šestý den po oplození. Tvoří jí dva typy buněk, tzv. trofektoderm a vnitřní buněčná hmota (ICM) uložená v dutině embrya (blastocel). Na obrázku 4 je k vidění typický příklad blastocysty. Při hodnocení kvality blastocyst se sledují 4 parametry: stupeň expanze, stav líhnutí neboli hatching, vzhled vnitřní buněčné masy a trofektoderm^[17].

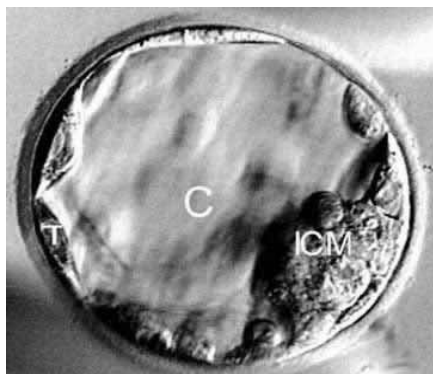
První dva parametry jsou hodnoceny současně a rozdělují blastocysty do tříd 1-6. Třída 1 zahrnuje mladé blastocysty, jejichž blastocel tvoří více než polovinu objemu. Nejsou zjevné žádné známky expanze. Do třídy 2 řadíme blastocysty s mírnou expanzí, ztenčenou zónou pellucidou a dutinou zaujímající více jak polovinu objemu embrya. Třídu 3 tvoří blastocysty vyplněné z více jak 50% blastocelem, s výraznou expanzí a velmi tenkou zónou pellucidou. Čtvrtá třída představuje blastocysty procházející procesem líhnutí. Třída 5 zahrnuje plně vylíhnuté blastocysty oddělené od zóny pellucidy. Třída 6 reprezentuje

blastocysty podrobené buněčnému odběru v rámci preimplantační genetické diagnostiky^[17].

Třetím hodnotícím parametrem je vnitřní buněčná masa označovaná jako ICM (inner cell mass). Rozděluje blastocysty do čtyř tříd A-D. Třída A zahrnuje blastocysty s výraznou ICM tvořenou kompaktními buňkami. Do třídy B řadíme blastocysty s malou buněčnou masou, kterou tvoří velké zřetelné buňky. Třída C představuje embrya ve stádiu blastocysty, jejichž vnitřní buněčná masa není přítomna. Třída D zařazuje blastocysty se zjevně poškozenými buňkami tvořící ICM^[17].

Posledním hodnotícím parametrem je stupeň trofektodermu, který rozděluje blastocysty do čtyř tříd také označených písmeny A-D. Třída A zahrnuje trofektoderm, který je tvořen velkým počtem buněk. Do třídy B řadíme blastocysty, jejichž trofektoderm reprezentuje malý počet buněk velké velikosti. Třída C představuje velmi chudou populaci trofektodermálních buněk a třída D degenerativní trofektoderm^[17].

Obrázek 4: Blastocysta. Zkratky ICM představují vnitřní buněčnou masu, C blastocel a T trofektoderm



Zdroj: http://www.acfs2000.com/art_services/blastocyst-transfer.html, [21.3.2012]

4. Terapeutické metody

Terapeutické metody zahrnují postupy přípravy spermií pro následující techniky ART, in vitro fertilizaci, intrauterinní inseminaci a další techniky prováděné za účelem léčby neplodnosti.

4.1. Příprava spermií před použitím pro ART

Ejakulát muže se skládá ze seminální plasmy, spermií, leukocytů, odloučených epitelálních buněk urogenitálního traktu a dalších komponent. Převážný podíl spermií tvoří zralé spermie, ale mohou se zde nacházet i nezralé vývojové formy. Pro metody asistované reprodukce jsou vhodné pouze zralé, pohyblivé a morfologicky normální spermie, které musí být oddělené od ostatních komponent ejakulátu. Za tímto účelem byly vyvinuty různé techniky separace spermií z ejakulátu^[18, 19, 20]. Pro přípravu spermií se volí technika separace jednak v závislosti na parametrech jednotlivého vzorku spermatu, jednak v závislosti na účelu zpracování vzorku. Pro některé metody asistované reprodukce, jako například intrauterinní inseminaci spermií do dělohy ženy (IUI) a in vitro fertilizaci s přidáním spermií do blízkosti vajíčka (konvenční IVF), je potřeba získat separací větší množství spermií. Pro jiné metody jako intracytoplasmatickou injekci spermie do vajíčka (ICSI) stačí získat pouze jednotlivé kvalitní spermie^[19]. V současné době se nejčastěji používají níže uvedené techniky separace spermií v rámci přípravy spermií pro účely asistované reprodukce.

Technika založená na jednoduchém promytí (simple washing)

Jednou z nejjednodušších technik využívaných pro separaci spermií od ejakulátu je simple washing. Tento postup je výhodné použít v těch případech, pokud jsou vzorky spermatu kvalitní. Postup je následující. Promícháme vzorek ejakulátu a naředíme ho s kultivačním médiem v poměru 1:1. Naředěná suspenze se následně vloží do 11ml zkumavky a centrifuguje se po dobu 5 až 10 minut při 300 až 500g. Počet otáček se volí podle typu centrifugy tak, aby bylo dosaženo vhodné přetížení. Po skončení centrifugace se opatrně odsaje supernatant. Peletu tvořenou spermiemi resuspendujeme

v dalším množství kultivačního média a opět centrifugujeme a výsledný supernatant znovu odsajeme. Peletu na dně zkumavky resuspendujeme šetrným pipetováním kultivačního média^[9]. Opakované odsátí supernatantu a opětovná resuspenzace se provádí z důvodu co nejdokonalejšího odstranění seminální plazmy. Nevýhodou této metody je fakt, že výsledná suspenze obsahuje jak pohyblivé, tak nepohyblivé spermie, proto je nutné používat tento postup pouze při zastoupení vysokého počtu spermií s normální morfologií a pohyblivostí v ejakulátu.

Technika založená na přímém vycestování spermií (Direct swim-up)

Při této technice se využívá schopnosti pohyblivých spermií vycestovat do kultivačního média a separovat se tak od seminální plazmy^[9]. K vycestování by mělo docházet přednostně před centrifugací, v jejímž důsledku dochází k rozrušení defektních spermií, které tvoří reaktivní formy kyslíku, čímž způsobují peroxidaci membránových lipidů ostatních funkčně kvalitních spermií. Aitken^[21, 22] prokázal, že sperma, které není primárně zbavené nečistot, vykazuje mnohem vyšší hodnoty kyslíkových radikálů v závislosti na předcházející centrifugaci než sperma předem oddělené od defektních spermií před samotným zakoncentrováním v centrifuze.

Cohen a kolektiv^[23] popsali tuto metodu následovně. Do 10 ml plastové zkumavky s kulatým dnem napipetujeme asi 2 ml kultivačního média, pod nějž opatrně pipetujeme přibližně 1,5 ml spermatu, tak aby se jednotlivé fáze nepromísily. Alternativou je prvotní nepipetování vzorku a následné opatrné převrstvení kultivačním médiem^[9]. Zkumavku necháme stát pod úhlem 45° asi hodinu při teplotě 37°C. Úhel sklonu zkumavky slouží ke zvětšení styčné plochy spermatu s kultivačním médiem. Poté vrchní zkalenou vrstvu (cca 1ml) odpipetujeme do centrifugační zkumavky, zředíme asi 1,5 ml média a dáme odstředit na 5 minut při 200g. Následně odsajeme supernatant a resuspendujeme zbylou peletu v 0,5 ml média^[23].

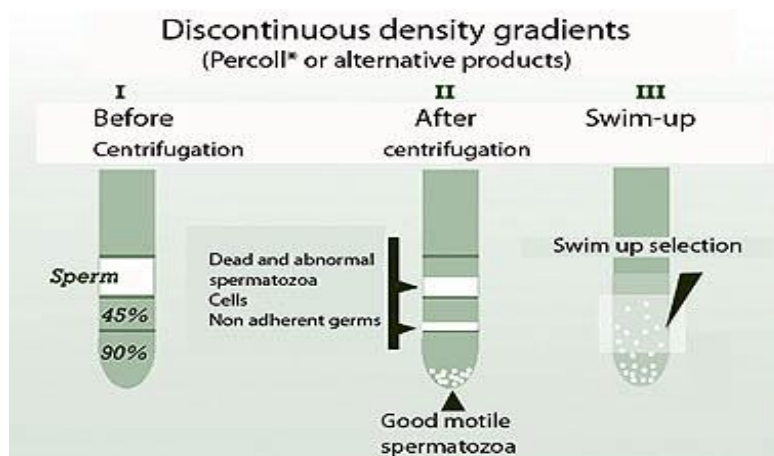
Výsledkem této metody je získání menšího počtu spermií, které jsou však plně pohyblivé. Technika je vhodná pro in vitro fertilizaci (IVF) a Intracytoplazmatickou injekci spermie (ICSI)^[9]. Schéma v Příloze 2 znázorňuje průběh metody přímého vycestování.

Technika založená na nespojitém hustotním gradientu

Tato metoda nám poskytuje nejlepší separaci kvalitních spermií od ostatních buněk a nežádoucích komponent^[9]. Princip této metody spočívá v rozdělení buněk ejakulátu podle jejich hustoty na základě dosažení izopyknotického bodu při centrifugaci. K vytvoření nespojitého hustotního gradientu se využívá koloidní roztok Percoll, u něhož Aitken^[21] zjistil, že nejspíše chrání spermie před poškozením při centrifugaci, právě v důsledku vytvoření diskretních vrstev o určité hustotě buněk.

Hustotní gradient se jednoduše vytvoří použitím média o dvou různých hustotách. Obvykle se využívá médium 40% hustoty pro horní vrstvu a 80% hustoty pro dolní vrstvu^[9]. Postup při provádění metody je následující. Nejdříve pipetujeme na dno zkumavky 1 ml 80% hustotního média a to opatrně převrstvíme 1 ml média o 40% hustotě^[19]. Po promíchání vzorku ejakulátu, jím převrstvíme námi připravené médium o hustotním gradientu. Dáme centrifugovat asi 20 minut při 300g^[9]. Během centrifugace se nežádoucí buňky, nečistoty a nepohyblivé spermie zachytí na rozhraní dvou vrstev, zatímco zcela pohyblivé spermie sedimentují na dno zkumavky, kde utvoří peletu^[19]. Odsajeme většinu supernatantu a resuspendujeme terčik v médiu a centrifugujeme. Tento krok provádíme několikrát, aby se spermie dostatečně očistily od zbylého média tvořícího hustotní gradient. Konečnou peletu opět resuspendujeme v médiu^[9]. Body I. a II. na obrázku 5 znázorňují průběh separace pomocí hustotního gradientu.

Obrázek 5: Separace spermií pomocí hustotního gradientu



Zdroj: http://www.ivf-art.com/page_spermatozoa4.html, [online: 10.2.2012]

Často je vhodné pro větší úspěšnost kombinovat jednotlivé techniky. V Centru Asistované Reprodukce SANUS v Hradci Králové využívají kombinaci prvních dvou metod. V prvním kroku se provede promytí spermií, čímž se spermie očistí od seminální plasmy, a v následujícím kroku dochází k separaci pohyblivých spermií od nepohyblivých užitím metody swim-up.

Vedle těchto tří základních metod sloužících pro přípravu spermií, existují ještě speciální techniky, užívané ve zvláštních případech.

Příprava spermií u HIV infikovaných vzorků

U HIV pozitivních pacientů virová RNA a provirová DNA jsou přítomné volně v seminální plasmě nebo v nezáradečných buňkách. Pro přípravu takovýchto vzorků se využívá kombinace hustotního gradientu pro separaci od HIV infikovaných buněk a seminální plasmy a následného vycestování pohyblivých spermií z pelety na dně zkumavky do média^[24]. Takto získané spermie se před vlastním použitím pro ART musí testovat pomocí RT-PCR na negativní HIV^[9]. Tyto procedury by se měly provádět pouze ve vysoce zabezpečených zařízeních, kde by bylo zabráněno kontaminaci negativních vzorků^[25].

Příprava testikulárních a epididymálních spermií

V některých případech je nutné použít pro získání spermií vzorek tkáně varlete nebo nadvarlete.

Důvodem pro aspiraci z nadvarlete je obvykle azoospermie způsobená obstrukcí kanálků. Výhodou takového vzorku je minimální kontaminace spermatozoí od nezáradečných buněk a červených krvinek. Pro velké počty získaných epididymálních spermií se provádí centrifugace pomocí hustotního gradientu a při nízkých počtech spermií je výhodné použít metodu simple washing.

Spermie varlete jsou získána otevřenou biopsií nebo biopsií perkutánní jehlou. Takto získaný vzorek obsahuje velké množství červených krvinek a nezáradečných buněk, proto je nutné uskutečnit další kroky k získání čistých spermií. Je možné využít enzymatických metod, kdy testikulární tkáň inkubujeme s kolagenásou po dvě hodiny při 37°C s tím, že každých 30 minut

vzorek promícháme. Následně centrifugujeme 10 minut při 100g a pozorujeme vzniklou peletu.

Lze použít i alternativu využívající mechanického zpracování tkáně. Testikulární tkáň mechanicky rozrušíme v kultivačním médiu za pomoci separačních jehel až do oddělení jednotlivých seminálních kanálků, ze kterých vypreparujeme jejich obsah^[9].

Příprava vzorků při retrográdní ejakulaci

Retrográdní ejakulace (RE) představuje stav, kdy se ejakulát při vyvrcholení dostává retrográdně do močového měchýře namísto běžného pohybu přes močovou trubici a ven z těla. Příčinou je neschopnost hrdla močového měchýře uzavřít vstup dost pevně během ejakulace. RE je též někdy označovaná jako „suchý orgasmus“^[26, 27, 28]. Girgis^[29] uvádí, že RE je nejčastější příčinou azoospermie. Spermie mužů, trpících touto poruchou, jsou však normální, mohou být získány z moče a použity při technikách asistované reprodukce. Pro zvýšení šance na přežití pohyblivých spermií v moči se podávají tablety jedlé sody k alkalizaci moče^[30]. Jelikož objem moče je veliký, je nutné provést centrifugaci při 500g na 8 minut, aby došlo k zakoncentrování. Takto zkoncentrovaný vzorek lze zpracovat metodou hustotního gradientu^[9].

Příprava spermatu u vzorků získaných po odborné asistenci

U mužů, kteří mají poruchu ejakulace, nebo jsou neschopni ejakulace, existuje též alternativa jak získat vzorek spermatu. Pro tyto účely se využívá elektroejakulace. Je to stimulace elektrodou zavedenou do konečníku a patří k nejčastěji používané metodě ve světě k získání spermií muže s poúrazovým přerušením míchy. Vibrostimulace je další možností pro získání spermií. Vzorky v takových případech obvykle obsahují velký počet spermií, ovšem s nízkým procentem pohyblivosti. Další úpravy spočívají v centrifugaci podle hustotního gradientu^[9].

4.2. Arteficiální inseminace a intrauterinní inseminace

Arteficiální inseminace (AI) představuje techniku, při níž dochází v těle ženy k oplození vajíčka spermiemi. Spermie jsou do pohlavního ústrojí ženy

vpraveny uměle. Na základě zdroje spermií rozlišujeme AIH (Arteficial insemination from husband), kdy spermie poskytne partner pacientky, a AID (Arteficial insemination from donor), kdy se použijí spermie dárce. Spermie se zavádí buď do oblasti děložního hrdla, nebo se vpravují přímo do děložní dutiny^[2]. Druhý uvedený postup je vhodnější, zkrátíme jím dobu cesty spermií k vajíčku, čímž zajistíme větší šanci na jejich přežití. K vajíčku se jich tak dostává mnohem více než je tomu u přirozené cesty početí. Tuto techniku, kdy jsou spermie zavedena hluboko do děložní dutiny, označujeme termínem intrauterinní inseminace^[5].

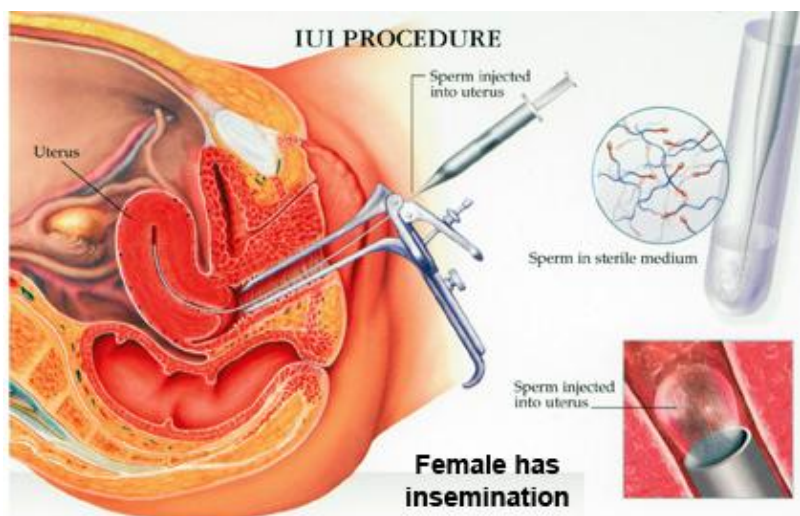
Při přirozeném způsobu početí se spermie během jejich cesty k vajíčku musí vypořádat s řadou překážek jako je kyselé prostředí pochvy či hlenová zátka čípku děložního. Intrauterinní inseminace obchází tyto bariéry, šance na početí se tudíž zvyšují^[5].

Intrauterinní inseminace je komplexní proces, který se skládá z několika na sebe navazujících kroků. První krok spočívá v hormonální stimulaci vaječníků. IUI může být provedena ve dvou případech. Pokud žena přirozeně neovuluje, je hormonální stimulace bezvýhradně nutná. Většinou se k ní ovšem přistupuje i v případě přirozeně ovulujících žen. Různé studie totiž prokázaly, že hormonální stimulace zvyšuje naději na otěhotnění^[5, 31, 32, 33]. Výsledkem hormonální stimulace je zisk většího počtu zralých vajíček najednou. Pro tyto účely byla vytvořena řada stimulačních protokolů, které využívají účinků Clomifen citrátu (CC), nebo jeho kombinace s gonadotropiny. Gonadotropiny jsou klíčovými podávanými preparáty, protože jejich hlavní funkcí je stimulace růstu folikulů. Dnes se nejběžněji kombinují s gonadotropiny uvolňujícím hormonem (GnRH)^[34, 35]. Po prvních 6-7 dnech léčby se provádí ultrazvukové vyšetření, při kterém se zhodnotí velikost a počet zrajících folikulů. Při dosažení velikosti průměru folikulu asi 16 mm, se k dozrání oocytů a indukci ovulace injektuje 5 000 – 10 000 jednotek choriogonadotropinu (hCG). Pro metodu intrauterinní inseminace je vhodné dozrání dvou či tří folikulů na jednu. Při vyšších počtech by hrozilo vícečetné těhotenství. Samotný krok IUI se provádí 40 hodin po podání tohoto hormonu^[6, 34]. V příloze 3 je ke zhlédnutí souhrn nejběžněji aplikovaných hormonálních preparátů při IUI.

Hormonální stimulace nám umožňuje přesně načasovat vhodnou dobu, kdy budou spermie přenesena do dělohy. Sperma získané od partnera masturbací v den inseminace se musí v laboratoři pročistit a upravit. Před odběrem ejakulátu je muži doporučeno nejméně tři dny sexuálně abstinovat^[35]. Získané sperma se nechá nejprve zkapalnět. Následně se uskutečňují separační kroky, které jsou zevrubně popsány v kapitole *Příprava spermií před použitím pro ART*. Kryokonzervované sperma lze také použít pro účely intrauterinní inseminace^[34].

Samotný zákrok inseminace spermií do dělohy není znatelně odlišný od běžného gynekologického vyšetření^[35]. Při zavádění spermií do dělohy přes děložní krček je důležité přistupovat velice opatrně, aby se zamezilo případné traumatizaci endometria. Krvácení a křeče způsobené nešetrnou manipulací při zákroku by měly za následek zkrácení životnosti spermií^[36]. Spermie jsou vpraveny do děložní dutiny pomocí úzkého katétru, do nějž se nasaje asi 0,5 - 1 ml roztoku se spermiemi^[35]. Ačkoliv jakákoliv spojitost se zvýšením šance na úspěch nebyla prokázána, po provedení zákroku se ženě doporučuje ještě po nějaký čas zůstat v poloze vleže^[37]. Po přenosu spermií se ženě nasazuje hormonální léčba za cílem podpory funkce žlutého tělíska a růstu děložní sliznice, aby se oplozené vajíčko mohlo snáze uhnízdit^[34]. Obrázek 6 níže manifestuje umístění katétru do děložní dutiny při zákroku IUI.

Obrázek 6: Schéma IUI procedury



Zdroj: <http://www.advancedfertility.com/insem.htm>, [online: 17.3.2012]

Podmínkou pro indikaci IUI je dobrý zdravotní stav ženy. Pacientka musí mít průchodný alespoň jeden vejcovod a dostatečně velkou děložní dutinu^[5]. Tato metoda je též vhodná pro léčbu žen trpících endometriózou středního stupně^[35]. Od muže je požadováno sperma, které nevykazuje výrazné odchylky od normy, spermie by tak měly nabývat normálního tvaru s progresivní pohyblivostí^[5]. I v takových případech se přesto někdy nedaří otěhotnět, a to především z imunologických důvodů, kdy jsou ve hlenu poševního hrdla přítomné protilátky, které brání průniku spermií k vajíčku. IUI je jednou z možností, jak tento problém obejít^[35]. V případě, kdy muž trpí závažným stupněm infertility, lze pro účely IUI použít spermie dárce^[36]. Následující tabulka 2 shrnuje stavy, kdy je vhodné použít darovaných spermií při procesu intrauterinní inseminace^[9].

Tabulka 2: Indikace pro inseminaci spermiemi dárce

Závažná mužská neplodnost
<ul style="list-style-type: none"> • azoospermie, např. Klinefeltrův syndrom, kongenitální bilaterální absence vasa deferens • závažná oligozoospermie • závažná teratozoospermie • závažná astenozoospermie • oligo/asteno/terato/zoospermie
Familiární/ genetické choroby, např. hemofilie, Huntingtonova choroba
Vážná inkompatibilita Rh faktoru

Zdroj: BRINSDEN, P. R. a S. F. MARCUS. Intrauterine insemination. In: *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. 3rd ed. Abingdon, Oxon: Taylor, 2005, s. 257-265. ISBN 1842142933.

4.3. In vitro fertilizace

In vitro fertilizace (IVF) neboli mimotělní oplodnění je nejčastější metodou asistované reprodukce, pomocí níž se v roce 1978 narodila Louise Brownová jakožto první tzv. dítě ze zkumavky. Lékaři, kteří stáli u tohoto úspěchu, který znamenal revoluci v léčbě neplodnosti, byli MUDr. Patrik Steptoe a MUDr. Robert Edwards^[38]. V České republice bylo prvního úspěchu dosaženo v roce 1982 u páru z Brna zásluhou prof. Ladislava Pilky^[39].

Princip IVF spočívá v několika na sebe navazujících krocích. V první řadě musí proběhnout stimulace vaječníků a odběr vajíčka. To je následně oplozeno spermiemi v laboratorních podmínkách. Dostatečně vyvinuté embryo je transferováno do děložní dutiny ženy^[39].

Tato metoda byla původně určena pro ženy, u nichž byla prokázána absence nebo vážné poškození vejcovodů (tubární faktor neplodnosti). Dnes se však k IVF lékaři uchylují téměř ve většině případů neplodnosti u párů, u nichž předešlé standardní léčebné postupy nevedly k úspěšnému výsledku^[40]. IVF je využíváno, pokud žena onemocní endometriózou, která může být příčinou její neplodnosti. Dalšími indikacemi je neplodnost podmíněná imunologickými poruchami, neplodnost způsobená neschopností vaječníků produkovat kvalitní vajíčka (ovariální selhání nebo obecně ovariální faktor), neplodnost z důvodu přítomnosti děložního faktoru nebo neplodnost z neznámé příčiny (idiopatická neplodnost)^[41].

Samotnému odběru vajíček předchází řízená hormonální stimulace vaječníků, díky níž dozrává ve vaječníku více vajíček najednou. S rostoucím počtem vajíček se zvyšují šance na získání většího počtu embryí a tím vzrůstá i naděje na budoucí otěhotnění^[39]. Podstatou hormonální stimulace vaječníků je injekční podávání hormonů s názvem gonadotropin. Gonadotropin je lidský folikulostimulační hormon, který je vylučován hypofýzou a jehož cílovým orgánem jsou vaječníky, kde způsobuje růst folikulů. Gonadotropin používaný v asistované reprodukci je komerčně připravený hormon vyráběný rekombinantní technikou. Množství gonadotropinu aplikovaného do těla ženy v rámci asistované reprodukce je mnohonásobně vyšší, než je endogenní produkce. Druhým opatřením při řízené ovariální stimulaci je zabránění endogenní produkci luteinizačního hormonu, který by mohl způsobit nežádoucí předčasné dozrání vajíček. Luteinizační hormon je v těle vyplavován z hypofýzy účinkem tzv. gonadoliberinů. Gonadoliberiny se tvoří v hypothalamu a na hypofýzu působí vazbou na specifické receptory. Léky, které blokují tyto receptory, se nazývají analoga gonadoliberinů. Jejich podání do těla ženy způsobí, že nedojde k vyloučení luteinizačního hormonu z hypofýzy. Luteinizační hormon podáváme ženě formou injekce až ve fázi dokončení

vývoje jednotlivých folikulů. Za 36 hodin po podání této injekce se provede odběr vajíček^[42, 43].

Celý průběh hormonální stimulace je pečlivě sledován. Monitorují se hladiny hormonů v krvi a pomocí ultrazvuku se kontroluje počet a stádium zralosti folikulů.

Odběr vajíček neboli ovum pick up (OPU) je minimálně invazivní chirurgický zákrok. Probíhá v celkové krátkodobé anestezii. Během operačního výkonu pod ultrazvukovou kontrolou, při níž je pacientce přes zadní klenbu poševní zavedena do vaječníků jehla připojená k odsávacímu zařízení, se provede odběr folikulární tekutiny obsahující vajíčka. Doba zákroku se odvíjí od počtu ovariálních folikulů, v průměru trvá 10-15 minut. Počet ovariálních folikulů je závislý na individuální reakci vaječné tkáně každé pacientky^[42].

Folikulární tekutina odebraná do zkumavek je přenesena do embryologické laboratoře. Zde zkušený embryolog hodnotí kvalitu a množství odebraných vajíček. Vajíčka oddělí od folikulární tekutiny a umístí je do výživného média, ve kterém jsou před spojením se spermii po dobu 6 hodin ponechány a uloženy ve speciálních vyhřívaných kultivačních boxech^[44].

Ve stejný den, kdy žena podstoupí odběr vajíček, přichází její partner do laboratoře a je vyzván k poskytnutí vzorku ejakulátu. Od muže je požadována několikadenní sexuální abstinence. Ejakulát se následně hodnotí a zpracovává technikami podrobně popsány v kapitole *Příprava spermií před použitím pro ART*. Vedle spermií z čerstvého ejakulátu lze pro účely IVF též použít zmražené spermie partnera nebo dárce^[38].

Po 6 hodinové kultivaci vajíčka, dochází v laboratoři k samotnému oplození vajíčka spermii. Tento zákrok prováděný v rámci metody mimotělního oplodnění se obecně nazývá jako konvenční nebo též standardní IVF. Jedná se konkrétně o krok přidání milionu spermií do blízkosti vajíčka v kultivačním médiu ve speciální kultivační misce a následné samovolné splnutí vajíčka se spermii. Při IVF jsou kladeny vysoké nároky na podmínky prostředí, proto jsou vajíčko a spermie uloženy do kultivátoru, kde je simulováno podobné prostředí jako v těle ženy (teplota 37°C, pH 7,3-7,4)^[39].

Po 16 až 18 hodinách je možné zhodnotit stav oplození. Známkou oplozeného oocyty je přítomnost pronukleů neboli prvojader (viz Obrázek 7)^[45]. Prvojádra jsou útvary obsahující organizované chromozomy, které jsou ohraničené jaderným obalem. Jedno prvojádro je samičí, druhé samčí, a každé nese jedinečnou genetickou informaci, jejímž splynutím vznikne nový jedinec. Někdy je pozorován oocyt, u kterého je přítomné pouze jedno prvojádro. Takový oocyt je z následné kultivace vyřazen. Je možné pozorovat i přítomnost 3 a více prvojader. I tato vajíčka jsou vyřazena z kultivace. Správně oplozený oocyt obsahuje 2 prvojádra a nazývá se zygota. Její genetickou výbavu tvoří 2 sady chromozómů (buňka je diploidní)^[46, 47].

Obrázek 7: Fertilizovaný oocyt - samčí a samičí pronukleus



Zdroj: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/REPRODUKCE2.htm#vyvoj>,
[online: 5.3.2012]

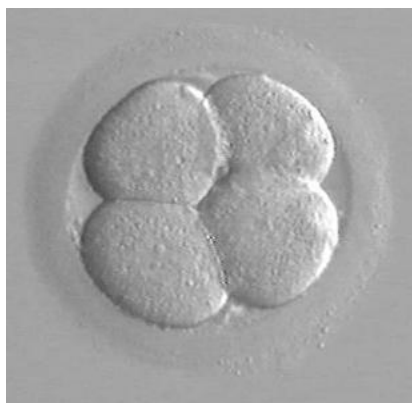
Oplozená vajíčka jsou přenesena do čerstvého kultivačního roztoku a za dalších 24 hodin dochází k vývoji embryí a k dělení buněk (rýhování)^[46]. Třetí den embryolog pozoruje embrya, jež by měla být ve stádiu dvou až čtyř buněčného vývoje. Čtvrtý den jsou pozorována šesti až osmi buněčná stadia. V kterémkoliv buněčném stádiu je možné embrya transferovat do dělohy ženy. Zbylá kvalitní embrya je vhodné zamrazit pro pozdější použití^[45]. Jednotlivá buněčná stadia jsou názorně vyobrazena na následujících obrázcích 8 a 9.

Obrázek 8: Dvojbuněčné embryo



Zdroj: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/REPRODUKCE2.htm#vyvoj>,
[online: 5.3.2012]

Obrázek 9: Čtyřbuněčné embryo



Zdroj: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/REPRODUKCE2.htm#vyvoj>,
[online: 5.3.2012]

Lze také využít tzv. prodloužené kultivace, kdy nedojde k embryotransferu během prvních 2 či 3 dnů, ale embrya se kultivují ještě další 3 dny a přenášejí se do dělohy ve formě kompaktace či blastocytu. Stádium blastocysty je pro transfer výhodnější, protože se jedná o transfer těch nejkvalitnějších embryí a tím se zvýší šance embrya na uhnízdění v děložní sliznici^[44].

Vzhledem k obrovskému pokroku v oblasti asistované reprodukce se zvýšily šance na úspěšné otěhotnění, zároveň však vzrostlo i riziko vícečetného těhotenství. Proto bylo nutné počet přenášených embryí v průběhu let redukovat^[45]. V současnosti jsou v České republice pacientkám přenášena maximálně dvě embrya^[41]. Počet transferovaných embryí se volí v závislosti na kvalitě embryí, příčině neplodnosti, věku ženy podstupující umělé oplodnění a její anamnéze^[45]. Je však preferován selektivní transfer jednoho embrya,

tzv. single embryo transfer (SET), z důvodu zabránění vzniku dvojčetné gravidity^[48].

Embryotransfer je jednoduchý bezbolestný zákrok, který nevyžaduje anestezii. Přes pochvu a děložní čípek se zavede do dělohy speciální transferový katétr, jehož obsahem je kultivační médium s transferovanými embryi. Příklad katétru používaného při transferu embryí do dělohy ženy je znázorněn na obrázku 10. Pro ubezpečení se o správnosti zavedení embryí do děložní dutiny je vhodné celou proceduru sledovat pomocí břišní ultrazvukové sondy. Po provedení transferu následně embryolog zkontroluje pod mikroskopem, zda byl obsah katétru skutečně vyprázdněn^[45].

Obrázek 10: Katétr užívaný při embryotransferu



Zdroj: http://www.ivf-art.com/page_IVF.html, [online: 5.3.2012]

4.4. Intracytoplazmatická injekce spermie do vajíčka

ICSI neboli Intra Cytoplasmic Sperm Injection v překladu znamená intracytoplazmatická injekce spermie do vajíčka. Jedná se o způsob oplodnění vajíčka, kdy je vybraná spermie vpravena do oocyту injekčně. Tato metoda byla poprvé úspěšně provedena v roce 1992 a od té doby se stala široce využívaným léčebným postupem^[49].

Využívá se zejména u párů, kde vyšetření spermiogramu nesplňuje parametry normy. Dále jde o páry s imunologickou příčinou neplodnosti, kdy byly prokázány protilátky bránící spojení spermie s oocytem, nebo tam kde byly diagnostikovány spermie s enzymatickou poruchou, které nemají schopnost proniknout obaly vajíčka.^[50] Dalšími indikacemi pro ICSI jsou předchozí selhání při oplodnění pomocí klasické metody IVF, při vyšším věku, při zisku malého počtu vajíček, při použití kryokonzervovaných spermií nebo při oplodnění za použití dárcovských pohlavních buněk^[51].

ICSI je prováděno u vajíček, která jsou získaná stejným postupem jako při standardním IVF^[50]. Příprava vajíček pro potřeby ICSI spočívá v odstranění kumulárních buněk tvořící coronu radiatu, abychom zpřístupnili oocyt

pro potřeby mikromanipulace. Odstranění buněk se provádí krátkodobým vystavením vajíčka účinkům enzymu hyaluronidázy, který naruší mezibuněčné spoje mezi jednotlivými buňkami. Následně opakovaným nasáváním vajíčka do mikropipety o průměru 150 mikrometrů dojde k mechanickému očištění vajíčka od okolních buněk. Z důvodu dosažení potřebného stádia zralosti oocyty je důležité, aby bylo vajíčko po odběru a před samotným zákrokem alespoň 3 hodiny inkubováno^[51].

Vlastní metoda spočívá v přímé injekci jedné spermie do cytoplazmy zralého vajíčka ženy^[50]. Pro ICSI, jakožto mikromanipulační techniku, je nezbytné specifické technické vybavení. Jedná se o invertovaný ICSI mikroskop a speciální držáky pro upevnění a pohyb mikromanipulačních pipet. Jedna z pipet slouží k uchopení vajíčka. Druhá pipeta je injekční a slouží k vpravení spermie do nitra oocyty^[52].

Spermii s nejpřirozenějším tvarem a zachovalým nebo nejlepším pohybem, která bude vpravena do vajíčka, vybírá pod mikroskopem embryolog. Těsně před ICSI musí dojít k narušení buněčné membrány vybrané spermie, aby se po vpravení do oocyty začal ze spermie uvolňovat faktor aktivující oocyt. Narušení membrány spermie se docílí přimáčknutím spermie ke dnu Petriho misky pomocí skleněné injekční pipety v úrovni střední části bičíku spermie. K imobilizaci spermie a jejímu narušení lze také využít laser^[51].

Znehybněná spermie je následně nasáta do injekční pipety tak, aby byla do oocyty vpravena hlavičkou napřed. Pomocí druhé, tzv. fixační pipety je vajíčko pevně zafixováno proto, aby mohla být mikromanipulace se spermií provedena přesně a aby nedošlo k poškození vajíčka. Vyvolaným podtlakem uvnitř fixační pipety se obal oocyty přisaje k jejímu ústí. Je důležité, aby se spermie v injekční pipetě nacházela v jejím ústí, aby byl následně do oocyty injikován minimální obsah média, ve kterém se spermie nachází. Injekční pipetou s připravenou spermií pronikneme zónou pellucidou a oolemou a nasajeme malé množství ooplasmu, abychom zajistili promísení spermie s ooplasmou. Tyto kroky jsou názorně k zhlédnutí na obrázcích 11 a 12 na následující straně. Spermii s nataženou ooplasmou následně vypustíme do nitra oocyty. Další kroky jsou shodné jako u standardní IVF^[52].

Obrázek 11: Přiblížení injekční (užší) pipety s nasátou spermií k oolemě vajíčka, které je zafixováno pomocí fixační (širší) pipety



Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3114573/figure/F9/>,
[online: 2.2.2012]

Obrázek 12: Proniknutí injekční pipety do nitra vajíčka se spermií a nasátí ooplasmu



Zdroj: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3114573/figure/F10/>,
[online: 2.2.2012]

4.5. Intracytoplasmatická injekce předem vybrané spermie (PICSI)

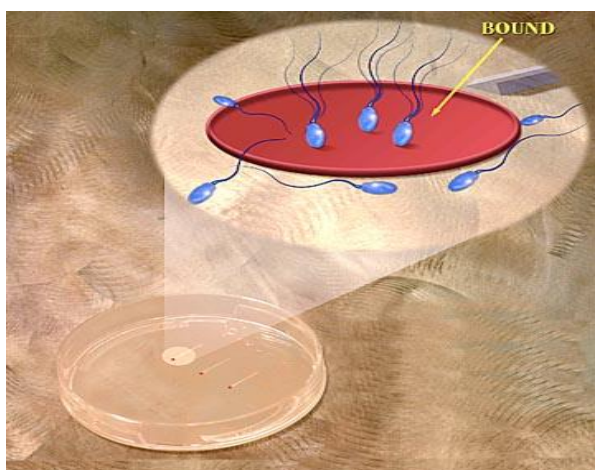
PICSI neboli preselected intracytoplasmatical sperm injection představuje relativně novou mikromanipulační techniku využívanou v rámci ART^[53]. Za jejím objevem stojí Dr. Gabor Huszar z Yaleské univerzity^[54]. Jedná se o modifikaci mikromanipulační techniky ICSI, při níž jsou spermie vybírány embryologem pouze na základě morfologických vlastností a motility. V některých případech ovšem tyto vizuální vlastnosti sloužící k posouzení vhodné spermie nemusí odrážet její skutečnou schopnost oplodnit vajíčko^[55]. Tento fakt vyplývá ze studií, při nichž se došlo k závěru, že pro oplození vajíčka jsou nejvhodnější

zralé spermie, u které je předpoklad minimálního poškození její genetické informace. Taková spermie ale mnohdy nemusí být nejrychlejší ani tvarově specifická, tudíž ji embryolog nevybere pro následnou intracytoplazmatickou injekci spermie do vajíčka^[56].

Pro úspěšnou penetraci a fertilizaci vajíčka jsou potřebné zralé spermie, jejichž hlavičky nesou na svém povrchu specifické receptory s afinitou k hyaluronanu. Mukopolysacharid hyaluronan je hlavní součástí mezibuněčné hmoty obalové vrstvy oocytu, tzv. cumulus oophorus^[57].

PICSI metoda spočívá v selekci spermií schopných právě této vazby na hyaluronan. Využívá se speciálně upravených Petriho misek, jejichž dno je pokryto vrstvou gelu obsahující hyaluronan (viz obrázek 13 níže). Spermie suspendované v médiu se napipetují na povrch tohoto gelu. Následuje migrace spermií ke gelu, na něž se zralé spermie naváží prostřednictvím hyaluronan-specifických receptorů. Po navázání na gel vykazují pohyb na místě. Spermie, které jsou nezralé, a tudíž neobsahují specifické receptory, se na gelovou vrstvu nemohou navázat. Pro ICSI jsou následně embryologem vybírány pouze spermie navázané na hyaluronan^[56, 57].

Obrázek 13: Petriho miska pro PICSI – zralé spermie přichycené ke gelu obsahující hyaluronan



Zdroj: <http://art.biocoat.com/products.htm>, [online: 10.2.2012]

Tato metoda je prakticky vhodná pro všechny pacienty, ale doporučuje se zejména tehdy, pokud byl muži zjištěn zvýšený podíl spermií s poškozenou integritou DNA. Dále se PICSI využívá v případech, kdy předchází oplození

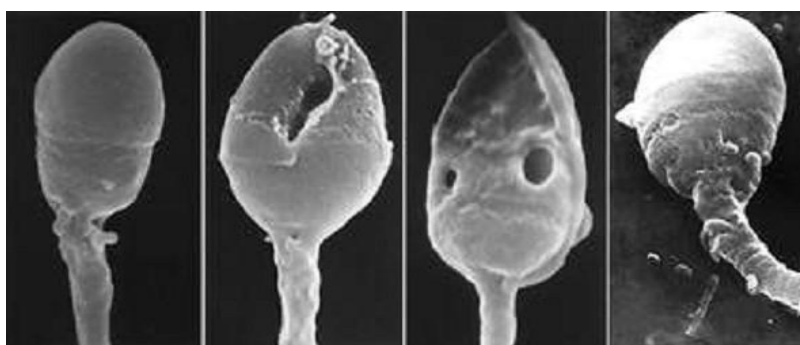
pomocí metody ICSI bylo neúspěšné, při opakovaných potratech nebo při špatné kvalitě embryí a spermií, a to jak čerstvých nebo zmražených^[53, 55].

4.6. IMSI

IMSI neboli Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection představuje jednu z dalších mikromanipulačních technik, vycházejících z klasické ICSI metody. V obou případech jsou metody založené na morfologickém posouzení spermie vhodné pro injekci do vajíčka. Rozdíl spočívá ve zvětšení pozorované spermie. Při ICSI embryolog pod mikroskopem hodnotí morfologii a motilitu spermie obvykle při dvouset až čtyřsetnásobném zvětšení. V takovém případě ale selekce spermie nemusí být dostačující, jelikož některé strukturální abnormality v jádrech spermií není možné při 400x zvětšení zjistit^[58, 59, 60].

IMSI je charakterizovaná detailním morfologickým vyšetřením vnějšího tvaru a vnitřních struktur živých spermií, které se označuje jako MSOME - Motile Sperm Organelle Morphology Examination^[61]. Pro tyto účely se využívá speciální invertovaný mikroskop s celkovým 6 600násobným zvětšením vybavený kamerou, která snímá obrázky a přenáší je na monitor počítače. Na následujícím obrázku 14 je příklad takového výstupu z počítače znázorněn^[62].

Obrázek 14: Zobrazení spermií elektronovým mikroskopem při metodě IMSI



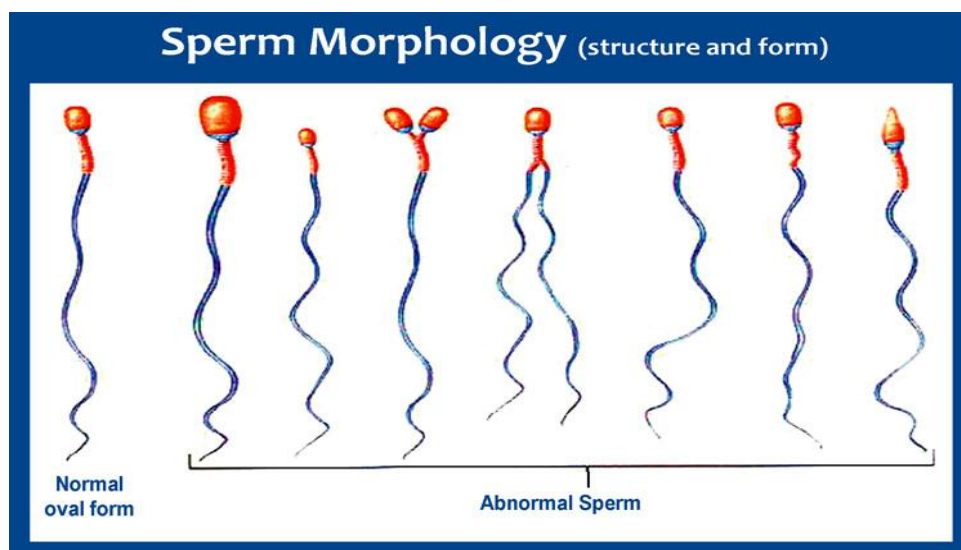
Zdroj:

<http://www.ivf.at/cscz/behandlung/k%C3%BCnstlichebefruchtung.aspx#IMSI>,
[online: 26.2.2012]

Pro IMSI připadají v úvahu jen ty pohyblivé spermie, které splňují následující kritéria. Prvním parametrem je velikost hlavičky spermie o délce

v rozmezí $4,75 \pm 0,28 \mu\text{m}$ a šířce $3,28 \pm 0,20 \mu\text{m}$. Pro kvalitní spermii je typický i tvar hlavičky^[63]. Jednotlivé tvary vyskytující se fyziologicky a patologicky u spermií jsou znázorněny níže na obrázku 15.

Obrázek 15: Normální a patologická morfologie spermií



Zdroj: <http://www.rscnewengland.com/faqs/examples/who-is-responsible.html>,
[online: 26.2.2012]

Parametry charakterizující vnitřní strukturu definují jádro jako jemné, symetrické, oválného tvaru a s homogenním jaderným chromatinem. Homogenita chromatinu je dána přítomností vakuol, která je nežádoucí. Pro účely IMCI jsou vhodné pouze spermie obsahující nejvýše jednu vakuolu, které odpovídá plocha menší než 4% velikosti jádra spermie^[64]. Hledání morfologicky normální spermie zabere kvalifikovanému pracovníkovi 60 až 210 minut v závislosti na kvalitě ejakulátu. Doporučuje se každý vzorek vyšetřovat dvěma embryology najednou, tak se zabrání co největšímu vlivu subjektivního pohledu při hodnocení^[62].

IMSI se využívá v případech, kdy se páry shledávají s opakovaným neúspěchem oplození či vývojem embryí při ICSI, nebo pokud je příčinou neplodnosti páru mužská infertility^[60, 65]. IMSI je relativně novou metodou využívanou v rámci asistované reprodukce^[61]. Ne všechna IVF centra mají možnost nabídnout svým pacientům tuto techniku vzhledem k velkým nárokům na speciální technické vybavení, které vyžaduje^[60].

4.7. Asistovaný hatching

Při přirozeném početí se embryo vyvíjí při průchodu vejcovodem, kde dochází ve většině případů k oplodnění vajíčka. Vajíčko a následně vyvíjející se embryo je chráněno fosfolipidovým obalem zvaným zona pellucida. Tento obal udržuje dělicí se buňky embrya v soudržném stavu. Před samotným uhnížděním v děloze však musí embryo ve stádiu blastocysty tento obal opustit, aby se mohlo dále vyvíjet a expandovat do prokrvené děložní sliznice. Tomuto procesu se říká líhnutí neboli hatching^[66, 67].

V případě mimotělního oplození pomocí techniky IVF dochází často k zpevnění zony pellucidy, která je jednou z možných příčin neplodnosti. Hammadeh et al^[68] ve své práci uvádí, že kultivace embryí v laboratorních podmínkách může mít negativní účinky na schopnost embryí podstoupit normální proces líhnutí, což má za následek nižší procento úspěšného uhníždění v děložní sliznici a dalšího vývoje embrya. Poukazuje též na fakt, že embrya získaná při IVF se vyznačují relativně vyšším stupněm vzniku cytogenetických abnormalit a buněčnou fragmentací^[68].

Cohen et al^[69] navrhl mikromanipulační techniku, která by zvýšila šanci na uhníždění embryí. Princip metody spočívá v šetrném narušení vaječného obalu, zony pellucidy, čímž je napomoženo vajíčku vyloupnout se z této skořápky.

Asistovaný hatching (AH) je doporučen ženám starším 40 let. U párů, které se již opakovaně setkávají s neúspěchem při pokusech mimotělního otěhotnění, je též vhodné aplikovat tuto metodu. Někdy se AH provádí v rámci metody ICSI, jindy je doporučeno podstoupit tuto metodu při diagnostikování současných vyšších hladin folikuly stimulujícího hormonu FSH. Asistovaný hatching je indikován v případech, kdy embryolog zjistí, že kultivovaná embrya mají abnormálně silnou obalovou vrstvu. Tužší zona pellucida se často vyskytuje u embryí, které byly dříve kryokonzervovány^[66, 67].

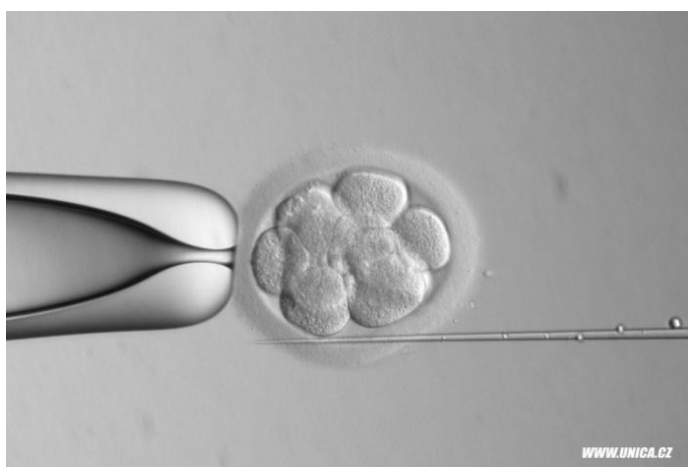
Asistovaný hatching je nejvhodnější provádět třetí den po oplození, kdy je embryo ve stádiu osmibuněčného vývoje. Se zvyšujícím se věkem ženy roste i tuhost a tloušťka zony pellucidy. Frekventovaněji se též vyskytuje u žen, které podstoupily hyperovulaci^[66].

Existují různé způsoby, jak lze provést asistovaný hatching. Jedná se o částečné vyříznutí zony, provrtání, zúžení zony použitím kyselin nebo účinek laseru^[68].

Mechanický hatching.

Do mikromanipulačního přístroje se upevní pipeta, která zafixuje embryo. Druhou, hatchingovou pipetou se šetrně naruší vnější ochranná zona embrya. Na obrázcích 16 a 17 níže je vyobrazen průběh

Obrázek 16: Asistovaný hatching: proděravění zony pellucidy pomocí tenké mikromanipulační pipety (1. krok)



Zdroj: http://unica.cz/USoubory/obrazky_ilustrace/ah_03.jpg, [online: 6.3.2012]

Obrázek 17: Asistovaný hatching: mechanické otírání zony pellucidy o fixační a mikromanipulační jehlu (2. krok)



Zdroj: http://unica.cz/USoubory/obrazky_ilustrace/ah_04.jpg, [online: 6.3.2012]

Chemický hatching.

Embryo zafixujeme proti pohybu fixační pipetou a druhou pipetou přidáme do blízkosti zony pellucidy kapku roztoku kyseliny sírové nebo chlorovodíkové. Ta způsobí narušení fosfolipidového obalu a vytvoření dostatečně velkého otvoru. Po aplikaci kyseliny musí být embryo pečlivě promyto v mycím roztoku, aby se dostatečně očistilo od zbývajících množství kyselého roztoku^[66].

Laserový hatching.

Jedná se o nejnovější, vysoce přesný, využívaný postup. Pomocí laserového paprsku vytvoříme přesný otvor s ostrými okraji v zoně pellucidě. Okolí paprsku je odstíněno od tepelných vlivů, tudíž nedochází k poškození embrya vysokými teplotami^[66].

4.8. PESA, MESA, TESA, TESE a micro-TESE

PESA, MESA, TESA, TESE a micro-TESE představují chirurgické metody, které slouží k získání spermií z epididymální nebo testikulární tkáně v závislosti na příčině azoospermie^[70]. Za azoospermii je označován stav, kdy nejsou v ejakulátu po centrifugaci přítomny žádné spermie. Tato diagnóza nemusí přímo znamenat mužskou neplodnost. Existují totiž případy, kdy se u mužů trpících azoospermii objevují spermie schopné fertilizace ve varlatech či nadvarlatech^[71]. Spermie, které se odeberou těmito technikami, se následně podrobí selekci jako při normálním odběru čerstvého ejakulátu a použijí se pro ICSI či kryokonzervaci^[70].

PESA neboli perkutánní epididymální aspirace spermií je chirurgický zákrok, který spočívá v nasátí epididymální tekutiny obsahující spermie pomocí injekční stříkačky jehlou, jejímž hrotem se propíchne kůžička scrota a za pomalého pohybování jehly tam a zpět uvnitř nadvarlete se díky podtlaku vyvolaném posunem pístu stříkačky nasaje čirý aspirát. Indikací k této metodě je azoospermie způsobená obstrukcí vývodných cest. Získ aspirátu představuje minimální hodnoty pohybující se kolem 0,1 ml. Epididymální tekutina je ze stříkačky přemístěna do zkumavky s ohřátým médiem pro přípravu spermií. V laboratoři se bezprostředně po odebrání aspirátu provádí mikroskopické hodnocení^[70].

PESA přináší řadu výhod, mezi něž řadíme jednoduchost v provedení zákroku, který nevyžaduje žádné mikrochirurgické vybavení. V závislosti na malé technické náročnosti se PESA vyznačuje svojí nízkou cenou. Její výsledky jsou ovšem více než uspokojivé^[72]. Při PESA zákroku hrozí minimální komplikace^[73]. Muži trpí jen výjimečně pooperativními bolestmi a již následující den je většina z nich schopná pracovat^[74].

MESA znamená mikrochirurgickou epididymální aspiraci spermií. První zmínky o této metodě se datují do roku 1985, kdy byla MESA poprvé popsána Temple-Smithem^[75]. MESA spočívá v provedení 2-3 cm řezu na scrotu. V této oblasti dojde k odhalení nadvarlete, jehož svrchní vrstva se nařízne pomocí ostrých mikrochirurgických nůžek^[70]. Urolog prohlíží epididymální tkáň s 8 až 15násobným zvětšením a snaží se vyhledat kanálky naplněné spermatickou tekutinou, které se opticky jeví nažloutle^[76]. Tekutina z epididymální tkáně je následně odebrána do silikonové zkumavky nebo je aspirována do tuberkulínové injekční stříkačky úzkou jehlou^[70].

Uvádí se, že 25 až 50 µl MESA aspirátu obsahuje kolem 75 milionů spermií. V závislosti na vysoké koncentraci spermií přítomných v nadvarlatech je potřeba mnohem menšího objemu tekutiny^[76]. Aspirát se poté opět přemístí do zkumavky s kultivačním médiem pro přípravu spermií a je okamžitě přenesen do laboratoře, kde se pod mikroskopem hodnotí. Při získání nedostatečného počtu spermií se chirurgický zákrok opakuje. Může se stát, že výsledky MESA metody nebudou i po opakování zákroku příznivé. V takových případech se přistupuje k TESA a TESE technikám^[70].

TESA neboli Testicular sperm aspiration – aspirace spermií z testikulární tkáně představuje metodu, při které je užitím injekční stříkačky s jehlou proveden vpich přes kůžičku scrota do testikulární tkáně. Samotný proces aspirace je podobný jako u metody PESA. Aspirát je následně vypuštěn do zkumavky, smíchan s kultivačním médiem pro přípravu spermií a neprodleně dopraven do laboratoře k zhodnocení. Výhoda této metody tkví v technické nenáročnosti, která se odráží i v příznivé cenové relaci. Pacienti, kteří podstoupili TESA, jen výjimečně trpí pooperativními obtížemi^[70]. K technice TESA se přistupuje v případě neobstrukční azoospermie. Lze ji také

použít u obstrukční azoospermie, v závislosti na kvalitě spermií se ovšem jedná o metodu třetí volby, které předchází MESA a PESA^[76].

TESE představuje akronym pro Testicular sperm extraction – extrakce spermií z testikulární tkáně. Tato metoda byla prvně popsána Devroeyem v roce 1995^[77]. TESE spočívá v provedení 2 cm chirurgického řezu skrz kůžičku scrota, tunicu vaginalis a dartos. Pomocí lehkého tlaku kladeného na varle dojde k vytlačení testikulární tkáně do vytvořeného otvoru. Tím se tkáň stává lépe viditelnou a umožňuje nám snáze vyhledat semenotvorné kanálky. Ostrými chirurgickými nůžkami se malá část tkáně odejme a vloží do kultivačního média pro přípravu spermií^[1]. Vyšetření v laboratoři předchází enzymatická či mechanická úprava tkáně. Pod mikroskopem laborant hodnotí přítomnost, kvalitu a stupeň zralosti mužských pohlavních buněk. V případě, kdy jsou pohlavní buňky nedovyvinuté, se ponechají dále kultivovat^[76].

Metoda je vhodná pro získání spermií od mužů trpících neobstrukční formou azoospermie. TESE volíme i u pacientů s Klinefelterovým syndromem nebo pacientů, jež prodělali zánětlivé onemocnění varlat^[76]. Nevýhodou může být případný vznik hematomu, infekce, krvácení či fibrotizace^[72].

Micro-TESE představuje méně invazivní mikrochirurgickou modifikaci TESE metody. První zmínky o této technice pocházejí od Schlegela z roku 1999^[78]. Díky zvětšení mikroskopu, které poskytuje Micro-TESE, jsou lékaři schopni lépe nasměrovat biopsii tak, aby zvýšili šance na získání co největšího počtu spermií. V závislosti na technické náročnosti, mikrochirurgické instrumentaci, relativně vysoké pořizovací i provozní ceně si tuto techniku může dovolit nabídnout pacientovi pouze pár center asistované reprodukce^[70].

Pomocí mikroskopu s 6 až 8násobným zvětšením se provede řez scrotem a tunicou albugineou, čímž dojde k odhalení testikulárního parenchymu. Jím je následně veden další řez tentokrát s 16 až 25násobným zvětšením mikroskopu. V testikulární tkáni jsou vyhledávána místa se zvětšenými kanálky, u nichž je největší pravděpodobnost výskytu pohlavních buněk. Pomocí mikrochirurgických kleští se taková oblast šetrně odebere a přemístí do Petriho misky s kultivačním médiem pro přípravu spermií. Před vlastní analýzou

je nutné uskutečnit procedury, při kterých bude tkáň chemicky či mechanicky ošetřena^[70].

4.9. Preimplantační genetická diagnostika

Preimplantační genetická diagnostika neboli Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) představuje relativně novou specializovanou metodu umožňující identifikaci chromozomálních aberací či monogenně dědičných chorob ještě před implantací embrya do dělohy ženy. Z definice tudíž vyplývá, že lze tuto metodu použít pouze ve spojitosti s programem in vitro fertilizace v rámci asistované reprodukce^[79].

PGD lze využít v případě vyšetření embryí, které se vyznačuje významnou informační hodnotou ve smyslu stanovení početních nebo strukturálních odchylek na chromozomech. Díky tomuto vyšetření lze vyloučit choroby vázané na konkrétní chromozomy a selektovat pouze zdravá embrya. Další z možných případů aplikace PGD je vyšetření pólových tělísek u doposud neoplozených vajíček. Tento způsob nám poskytuje informace pouze o genetické výbavě matky, nikoliv otce^[80].

PDG předchází oplození vajíčka pomocí metody ICSI. Vzniklá embrya se kultivují do stádia 6-8 buněk. Poté se pomocí mikromanipulační techniky mechanicky otevře zona pellucida a odeberou se 1 až 2 blastomery, u kterých se provede vlastní PGD. Tento krok je znázorněn na obrázku 18 na následující straně^[80]. Některé zdroje též uvádí, že je možné pro preimplantační genetickou diagnostiku získat vyšetřovaný materiál biopsií pólového tělíska nebo blastocysty^[79].

Obrázek 18: PGD - biopsie blastomery



Zdroj: http://trialx.com/curetalk/wp-content/blogs.dir/7/files/2011/05/diseases/Preimplantation_Genetic_Diagnosis_Pgd-3.gif, [online: 20.3.2012]

PGD zahrnuje dvě základní metody, cytogenetické vyšetření a molekulárně genetické vyšetření^[80]. Cytogenetická diagnostika představuje především metodu FISH neboli Fluorescent In Situ Hybridization, která slouží k identifikaci početních a strukturních chromozómových aberací s použitím specifických fluorescenčně značených DNA sond. Další z možných screeningových metod používaných pro diagnostiku chromozomových aberací je komparativní genomová hybridizace CGH^[81]. Screening se provádí zejména u chromozomů 13, 18, 21, X a Y, jež představují nejčastější příčinu chromozomálních aberací jako je Downův syndrom, Edwardsův syndrom či Patauův syndrom. Screening může být doplněn také o vyšetření chromozomů 15, 16 a 22, jejichž trisomie jsou nejčastěji prokazované aberace při potratech^[79].

Molekulárně genetické vyšetření slouží ke stanovení genových mutací a k vyloučení monogenetického onemocnění u potomka^[81]. K těmto účelům se využívá metoda PCR. Blastomera získaná biopsií se nechá rozpustit ve zkumavce, která obsahuje roztok s enzymy a dalšími látkami. V termocykléru je následně jaderná DNA pomnožena. Poté se ve vzorku zjišťuje, zdali je přítomná DNA typická pro konkrétní gen, nebo se jedná o změnu genu^[80].

Na základě výsledku vyšetření odebraných blastomer 5. den od oplození vybereme zdravá embrya, která nenesou sledovanou vadu. Tato embrya mezitím dosáhla stádia blastocysty a jsou připravena na transfer. Při získání většího počtu embryí, u nichž nebyla prokázána genetická vada, se přistupuje k jejich zmrazení pro případné další transfery^[82].

Lékaři se k preimplantační genetické diagnostice uchylují v následujících případech. Pokud alespoň u jednoho z partnerů byla prokázána balancovaná chromozomální aberace. V případě, kdy je v rodině zaznamenán výskyt některé dědičné choroby vázané na pohlavní chromosomy nebo dědičné choroby vázané na autozomy. Jedná se o onemocnění jako je hemofilie, Duchenova muskulární dystrofie či cystická fibróza. Dalším indikačním faktorem je vyšší věk ženy. Využívá se i v případech opakovaných spontánních potratů v prvním trimestru těhotenství. K PGD se přistupuje při opakovaných předešlých neúspěších v IVF cyklech, pokud jsou u muže trpícího těžkou formou oligoasthenozoospermie prokázány meiotické poruchy, nebo v případě inkompatibility v krevních skupinách Rh a Kell systému^[80].

5. Kryokonzervační metody

Kryokonzervační techniky slouží k uchovávání zárodečných buněk a embryí za velmi nízkých teplot. Zamražení na teplotu tekutého dusíku $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ se provádí za účelem pozdějšího využití buněk v rámci ART^[83].

Rutinní praxí je kryokonzervace spermií a embryí. Relativně novou metodu představuje kryokonzervace ženských pohlavních buněk. Při zmražení oocytů se ovšem vědci střetávají s řadou problémů a procento použitelných vajíček po rozmražení je stále velmi nízké^[84]. Zmražení vajíček, by pomohlo vyřešit problémy u mladých žen trpících onkologickým onemocněním. Metoda by umožňovala takovýmto ženám zamrazit své pohlavní buňky před podstoupením léčby, která vede k nenávratnému poškození zárodečné tkáně a tudíž k neplodnosti^[85].

Mražení ovariální tkáně probíhá stále na experimentální úrovni. Tkáň se před zahájením cytotoxické léčby odebere a po jejím skončení je opět implantována zpět do pánevní dutiny^[86, 10].

Doba možného skladování ve zmraženém stavu je teoreticky nekonečná. Prakticky jsou ale zmražené buňky využívány pro ART skladovány jen do uplynutí expirační doby, která je pro spermie 22 let a pro embrya 20 let^[10]. Rozhodující okamžik v procesu kryokonzervace nastává při zmražení a rozmražení buněk. Při ochlazování pod hodnotu 0°C se zvyšuje koncentrace solí, mění se osmotický tlak a může docházet k precipitaci proteinů. Buňka je ohrožena také mechanicky. Vznikající ledové krystalky mají větší objem než voda, mohou tudíž roztrhat buněčné membrány^[87].

Kryokonzervaci lze provést dvěma hlavními způsoby. Využívá se metoda pomalého nebo rychlého zmražení.

Pomalá zmrazovací technika představuje postupné ochlazování buněk během 2-4 hodin. Postup se provádí buď manuálně, nebo pomocí mrazících boxů s naprogramovatelnými změnami teplot^[88]. Manuální metoda dnes již téměř nemá uplatnění^[89]. Užíváním mrazících boxů s nastavitelnou teplotou se zvýšila reprodukovatelnost celého zmrazovacího procesu. Pomocí softwaru se naprogramuje proces chlazení z $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ při rychlosti $1,5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$,

poté se rychlost mrazení změní na 6 °C / min. Nakonec se brčka uloží do tekutého dusíku při teplotě -196 °C^[90].

Rychlé zmrazení poprvé navrhl Sherman^[91]. V závislosti na objemu a vzdálenosti od kapalného dusíku se v jeho párách utváří teplotní gradient. Vzorek se nejprve smíchá s odpovídajícím množstvím kryoprotektiva. Vzniklou směsí se následně plní pejetky, úzká brčka o průměru 1 – 2 mm a délky 100 až 120 mm, nebo kryozkumavky. Vzorek se nechá inkubovat při teplotě 4 °C po dobu 10 minut, poté se umístí do par dusíku v úrovni 15-20 cm nad kapalinou (-80 °C) po dobu 10-15 minut. Po uplynutí této doby se vzorky ponoří do tekutého dusíku.

Pejetky nebo kryozkumavky obsahující vzorek ve směsi s roztokem kryoprotektiv se uskladňují v kryokontejnerech, velkých termoskách, které jsou naplněné tekutým dusíkem.

K zamezení či minimalizaci škodlivých účinků, doprovázející proces kryokonzervace se doporučuje využívat následujících postupů.

1) Ke každému vzorku se přidává konkrétní kryoprotektivum, které buňky postupně odvodní a tím znemožní tvorbu velkých ledových krystalů, které mají tendenci roztrhnout jemné buněčné struktury^[87]. Pro embrya ve stádiu zygoty s vytvořenými prvojádry a pro dvou a čtyřbuněčná embrya se jako kryoprotektivum používá 1, 2-propandiol^[92], pro embrya ve stádiu blastocysty glycerol^[93].

2) Vhodné je využít metody ultrarychlého zmrazení za přítomnosti vysokých koncentrací kryoprotektiv. Během tohoto procesu nazývaného vitifikace se zárodečné buňky a embrya vkládají přímo do tekutého dusíku. Nedochází tak k tvorbě ledových krystalů, které by poškozovaly buněčné struktury, nýbrž k tuhnutí vody jako podchlazené kapaliny ve sklovité formě^[87]. Vitifikace se stala v posledních letech nejvíce využívanou technikou v kryokonzervaci embryí a oocytů. Udává se, že vitifikovaná embrya mají více jak 95% šanci na přežití a svojí kvalitou jsou srovnatelné s čerstvými embryi^[94]. Rychlost zmrazení při vitifikaci dosahuje hodnot 200 – 2000 °C/sec^[87].

3) Na experimentální úrovni se uvažuje o použití anti-freeze proteinů, které by umožnily překonat zmrazovací proces bez poškození buňky^[87].

Kryokonzervace spermií

Spermie jsou zmražena v případě dárcovství spermatu. Podle zákona se sperma dárce, který byl podroben vyšetření krve na sexuálně přenosné choroby, zamrazí na 180 dní. Poté následuje znovu vyšetření na sexuálně přenosné choroby. Až po tomto druhém vyšetření, které nás ujistí o negativních výsledcích, je možné vzorek spermatu použít pro účely ART. Metody kryokonzervace umožnily v rámci center asistované reprodukce vznik spermobank^[87].

Dalšími důvody pro využití kryokonzervace spermatu jsou onkologická onemocnění. Mužům, kteří musí podstoupit chemoterapii, hrozí vlivem užívání cytostatik riziko porušení funkce spermií. Mnohdy jsou však následky daleko větší a vedou až k úplné neplodnosti v důsledku zničení spermatogeneze. Dále může být zmraženo sperma manžela pacientky před jeho odjezdem na dlouhou dobu do zahraničí. Při azoospermii, která je způsobená obstrukcí vývodných cest, se spermie dají získat odběrem přímo z testikulární nebo epididymální tkáně. Abychom nemuseli náročný chirurgický zákrok znovu opakovat, spermie získané tímto způsobem se taktéž zamrazují^[87].

Spermie rozmražené po kryokonzervaci, tzv. kryospermie lze po promytí od seminální plasmy podle jejich počtu aplikovat buď v rámci intrauterinní inseminace do děložní dutiny, nebo při nízkých počtech nebo jejich horší kvalitě je lze využít při ICSI^[87].

Kryokonzervace embryí

Kryokonzervace embryí je hojně využívána zejména v těch případech, kdy v rámci metody IVF došlo k oplození většího počtu vajíček, než lze implantovat zpátky do děložní dutiny ženy. Zbylá zdravě se vyvíjející embrya se zamrazují pro pozdější případné použití.

Ke kryokonzervaci přistupujeme v případě, kdy chceme dosáhnout synchronizace cyklu dárkyně a příjemkyně vajíčka, dále pokud žena nemůže podstoupit transfer embryí do dělohy hned po odběru nebo pokud ženě hrozí zdravotní potíže jako polypy děložního hrdla nebo endometrální polypy. Kryokonzervace embryí představuje šanci na pozdější otěhotnění u žen, jímž bylo diagnostikováno onkologické onemocnění, a musí tudíž podstoupit

chemoterapeutickou léčbu, která s velkou pravděpodobností poruší funkci jejich ovariální tkáně^[84].

Nejvyšší možné vývojové stadium embrya, které se ještě využívá ke kryokonzervaci, je tzv. expandovaná blastocysta, jež vzniká 120 hodin po oplození. Nejmladší kryokonzervované stadium je zygota (vajíčko 16 hodin po oplození)^[84].

Embrya získaná po rozmražení se přenáší do dělohy ženy v rámci procedury zvané kryoembrytransfer (KET). KET se provádí buď u žen s přirozeným cyklem se stabilní hladinou vlastních hormonů, nebo v opačném případě, kdy je cyklus nepravidelný, se děloha uměle připraví podáváním estrogeneru, díky kterému děložní sliznice naroste. Estrogen zároveň tlumí sekreci vlastních hormonů^[84].

6. Statistické parametry

Léčba neplodnosti má výrazný pravděpodobnostní charakter. K správné indikaci léčby mohou napomoci statistické parametry, které udávají procentuální úspěšnost početí dítěte. Existují dva statistické parametry užívané v ART. Jedná se o pregnancy rate (PR) a implantation rate (IR).

Pregnancy rate udává počet těhotných žen ku počtu provedených embryotransferů. Jednotlivé metody ART nelze statisticky vyhodnocovat, jelikož jedna doplňuje druhou. Hodnotí se až výsledek celku, tj. počet těhotných ku počtu žen, které podstoupily transfer. Mohou se však tímto parametrem porovnávat různé kategorie:

- podle věku ženy,
- podle počtu transferovaných embryí,
- podle dne transferu (tj. různého stádia vývoje embryí),
- podle typu použitého stimulačního protokolu,
- podle pořadí podstoupeného IVF cyklu,
- podle toho, zda jde o embrya čerstvá nebo zmražená,
- podle toho, zda jde o embrya z vlastních vajíček nebo darovaných^[8].

Následující tabulky znázorňují pregnancy rate a implantaion rate v závislosti na určitých kategoriích.

Tabulka 3: Pregnancy rate podle charakteru použitých zárodečných buněk a embryí

Použité zárodečné bunky a embrya	Pregnancy rate PR (%)
Fresh ¹ IVF cykly s vlastními oocyty	47,5
Fresh IVF cykly s darovanými oocyty	45,7
KET ² s vlastními embryi	33,3
KET s darovanými oocyty	31,8

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

¹ Fresh transfer - transfer embryí vzniklých v rámci IVF (nemražených)

² KET – kryoembryotransfer

Tabulka 4: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty v závislosti na typu stimulačního protokolu

Protokol	PR (%)
Antagonista	43,1
DAP	54,5

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 5: KET s vlastními embryi ~ příprava endometria

	PR (%)
KET s vlastními embryi se stimulací endometria	32,3
KET s vlastními embryi bez stimulace endometria	34,6

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 6: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty dle fertilizační metody, pořadí cyklu, dnu transferu

Fertilizační metoda	PR (%)
IVF	41,7
ICSI	48,3
MESA	50,0
Pořadí cyklu	
1	53,8
2	40,0
3	38,1
4	27,3
Den transferu (ET)	
3	41,9
4	54,1
5	66,7

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 7: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty ~ počet transferovaných embryí

Počet embryí	PR (%)
eSET	44,4
SET	15,4
2	52,2

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 8: KET s vlastními embryi ~ počet transferovaných embryí

Počet embryí	PR
eSET	31,25
SET	26,1
2	37,6

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 9: Fresh IVF cykly s darovanými oocyty ~ počet transferovaných embryí

Počet embryí	PR
eSET	66,7
SET	33,3
2	44,7

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Tabulka 10: průběh těhotenství u dosažených gravidit

	n-G	n-abort (%)	n-GEU	n-jednočetná G (%)	n-dvojčetná G (%)
Fresh IVF cykly s vlastními oocyty	113	16 (14,2%)	0	69 (61,1%)	28 (24,8%)
KET s vlastními embryi	50	18 (36,0%)	0	24 (48,0%)	8 (16,0%)

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

Druhý parametr implantation rate udává počet nidovaných (uchycených) embryí v děloze ku všem transferovaným embryím.

Tabulka 11: Implantation rate (IR)

	n-jednočetná G (%)	n-dvojčetná G (%)
Fresh IVF cykly s vlastními oocyty	69 (61,1%)	28 (24,8%)
KET s vlastními embryi	24 (48,0%)	8 (16,0%)

Zdroj: Statistiky CAR Sanus, Hradec Králové

7. Závěr

Asistovaná reprodukce představuje jednu z možností léčby neplodnosti, pokud léčba pomocí hormonálních léků či provedeného chirurgického zákroku nejsou dostačujícím krokem. Asistovaná reprodukce jakožto moderní lékařský obor se tak pro mnohé páry po celém světě stává jedinou šancí na početí vlastního dítěte. Bohužel ne pro všechny páry je tento postup vhodný. V takových případech je možné přistoupit k adopci či pěstounské péči. Lidé by si měli uvědomit, že neplodnost není jen problémem ženy nebo muže, nýbrž se jedná o nemoc páru. Podstoupení léčby neplodnosti pomocí asistované reprodukce je náročnou záležitostí. Ať už se jedná o finanční, časovou nebo psychickou stránku. V uplynulých 20 letech došlo v oblasti léčby neplodnosti k obrovskému pokroku ať už zásluhou nových objevů a poznatků v embryologii a gynekologii, ale také zásluhou moderních technologií.

Tato bakalářská práce byla sepsána s cílem seznámení se s metodami, které jsou poskytovány neplodným párům v Centrech asistované reprodukce. V současné době je asistovaná reprodukce stále častěji skloňovaným pojmem. Svůj podíl na tom nese především fakt, že vlivem soudobého upřednostňovaného životního stylu se zvyšují počty párů trpících neplodností, které se uchylují k léčebným postupům v rámci ART. V České republice se ročně narodí více než 3% dětí ze zkumavek a předpokládá se, že se tento číselný údaj bude nadále zvyšovat.

I přesto, že se jedná o velice aktuální téma, se dá říci, že ne ve všech směrech týkajících se této problematiky, je veřejnost dostatečně obeznámena. To byl také jeden z klíčových podnětů proč se zabývat zrovna tímto tématem.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na popis jednotlivých metod, prováděných v asistované reprodukci. Jedná se o metody diagnostické, terapeutické a kryokonzervační. Soustředila jsem se zejména na in vitro fertilizaci, která je klíčovým postupem, z něhož ostatní techniky vychází a pomocí různých modifikací a použití technického vybavení poskytují v konkrétních případech lepší šance na otěhotnění. Při studování jednotlivých

technik asistované reprodukce jsem svou pozornost věnovala také příčinám, které vedly k jejich indikaci.

Jak rozbor metod v této práci ukazuje, je velice složité až nereálné učinit obecný závěr, který by jasně určoval, jak v léčbě neplodnosti postupovat a jakou metodu aplikovat. Je totiž nutné přistupovat ke každému páru individuálně a v závislosti na jeho příčinách neplodnosti vybrat tu metodu, která je pro daný pár ta nejvhodnější a poskytuje mu tak co největší šanci na početí vytouženého dítěte.

8. Seznam použitých zkratk

AH	Asistovaný hatching
ART	Techniky asistované reprodukce
DFI	DNA fragmentační index
HBA	Hyaluronan binding assay
ICM	Inner cell mass
ICSI	Intracytoplazmatická injekce spermie do vajíčka
IMSI	Intracytoplazmatická injekce morfologicky selektované spermie
IR	Implantation rate
IUI	Intrauterinní inseminace
IVF	In vitro fertilizace
KET	Kryoembryotransfer
MESA	Mikrochirurgická epididymální aspirace spermií
Micro-TESE	Mikrochirurgická extrakce spermií z testikulární tkáně
PESA	Perkutánní epididymální aspirace spermií
PGD	Preimplantační genetická diagnostika
PICSI	Intracytoplazmatická injekce předem vybrané spermie
PR	Pregnancy rate
RE	Retrográdní ejakulace
SET	Single embryo transfer
TESA	Aspirace spermií z testikulární tkáně
TESE	Extrakce spermií z testikulární tkáně

9. Seznam obrázků a tabulek

Obrázky:

Obrázek 1: Souprava pro HBA test	- 12 -
Obrázek 2: Embryo ve stádiu osmibuněčného vývoje	- 13 -
Obrázek 3: Embryo ve stádiu moruly	- 14 -
Obrázek 4: Blastocysta. Zkratky ICM představují vnitřní buněčnou masu, C blastocel a T trofektoderm	- 15 -
Obrázek 5: Separace spermií pomocí hustotního gradientu	- 18 -
Obrázek 6: Schéma IUI procedury	- 22 -
Obrázek 7: Fertilizovaný oocyt - samčí a samičí pronukleus	- 26 -
Obrázek 8: Dvojbuněčné embryo	- 27 -
Obrázek 9: Čtyřbuněčné embryo	- 27 -
Obrázek 10: Katétr užívaný při embryotransferu	- 28 -
Obrázek 11: Přiblížení injekční (užší) pipety s nasátou spermií k oolemě vajíčka, které je zafixováno pomocí fixační (širší) pipety	- 30 -
Obrázek 12: Proniknutí injekční pipety do nitra vajíčka se spermií a nasátí ooplasmu	- 30 -
Obrázek 13: Petriho miska pro PICSI – zralé spermie přichycené ke gelu obsahující hyaluronan	- 31 -
Obrázek 14: Zobrazení spermií elektronovým mikroskopem při metodě IMSI	- 32 -
Obrázek 15: Normální a patologická morfologie spermií	- 33 -
Obrázek 16: Asistovaný hatching: proděravění zony pellucidy pomocí tenké mikromanipulační pipety (1. krok)	- 35 -
Obrázek 17: Asistovaný hatching: mechanické otírání zony pellucidy o fixační a mikromanipulační jehlu (2. krok)	- 35 -
Obrázek 18: PGD - biopsie blastomery	- 40 -

Tabulky:

Tabulka 1: Výsledky vyšetření spermiogramu	- 11 -
Tabulka 2: Indikace pro inseminaci spermiemi dárce	- 23 -

Tabulka 3: Pregnancy rate podle charakteru použitých zárodečných buněk a embryí.....	- 46 -
Tabulka 4: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty v závislosti na typu stimulačního protokolu.....	- 47 -
Tabulka 5: KET s vlastními embryi ~ příprava endometria.....	- 47 -
Tabulka 6: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty dle fertilizační metody, pořadí cyklu, dnu transferu	- 47 -
Tabulka 7: Fresh IVF cykly s vlastními oocyty ~ počet transferovaných embryí.....	- 47 -
Tabulka 8: KET s vlastními embryi ~ počet transferovaných embryí.....	- 48 -
Tabulka 9: Fresh IVF cykly s darovanými oocyty ~ počet transferovaných embryí.....	- 48 -
Tabulka 10: průběh těhotenství u dosažených gravidit	- 48 -
Tabulka 11: Implantation rate (IR).....	- 48 -

10. Seznam použitých zdrojů

[1]: ŘEŽÁBEK, K. *Léčba neplodnosti*. 4., aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2008, 171 s. Pro rodiče. ISBN 978-80-247-2103-3 (BROŽ.).

[2]: ŘEŽÁBEK, K. *Asistovaná reprodukce: průvodce ošetřujícího lékaře*. [1. vyd.]. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, 2008, 112 s. Farmakoterapie pro praxi, sv. 32. ISBN 978-807-3451-547.

[3]: DE MELO-MARTIN, I. On Cloning Human Beings. *Bioethics*. 2002, roč. 16, č. 3, s. 246-265. ISSN 1467-8519. DOI: 10.1111/1467-8519.00284. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1467-8519.00284>

[4]: KLEINOVÁ, A. Nejčastější příčiny neplodnosti a metody asistované reprodukce. *Pharma news* [online]. 2008, č. 6 [cit. 2012-03-25]. Dostupné z: http://www.pharmanews.cz/2008_06/site/clanek5.html

[5]: MRÁZEK, M. *Umělé oplodnění 1*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2003, 62 s. Odborná léčba v moderní medicíně. ISBN 80-725-4413-6.

[6]: WEISS, P. *Sexuologie*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2010, 724 s. ISBN 9788024724928 (VÁZ.).

[7]: COOPER, T. G., NOONAN, E., VON ECKARDSTEIN, S. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update* [online]. 2010, roč. 16, č. 3 [cit. 2012-03-18]. ISSN 1460-2369. DOI: 10.1093/humupd/dmp048. Dostupné z: <http://humupd.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/dmp048>

[8]: ZADROBÍLKOVÁ, I. *Ústní sdělení*. [cit. 2012-04-03]

[9]: WHO *laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization, c2010, 271 s. ISBN 92-415-4778-2.

[10]: ZADROBÍLKOVÁ, I. *Metody asistované reprodukce*. Výuková prezentace. Centrum asistované reprodukce Sanus, Hradec Králové, 2012.

[11]: ABOUT SCSA DIAGNOSTICS: A Step In The Right Direction. SCSA *Diagnostics: A vital step in screening male fertility* [online]. © 2012 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <https://www.scsadiagnostics.com/about-the-test>

[12]: FLOW CYTOMETRY. SCSA *Diagnostics: A vital step in male fertility* [online]. © 2012 [cit. 2012-03-18]. Dostupné z: <https://www.scsadiagnostics.com/flow-cytometry>

[13]: HUSZAR, G, CELIK-OZENCI, C., CAYLI, S et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], 2003, roč. 79, č. 3, 1616–1624. ISSN 0015-0282.

[14]: YE, H. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. *Human reproduction* [online]. 2006, roč. 21, č. 6, s. 1545-1550 [cit. 2012-03-18]. ISSN 1460-2350. DOI: 10.1093/humrep/del008. Dostupné z: <http://www.humrep.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/del008>

[15]: TVRDOŇOVÁ, K., PILKA, L. a D. RUMPÍK. MORFOLOGICKÁ KVALITA EMBRYÍ A JEJÍ VLIV NA ÚSPĚŠNOST LÉČBY NEPLODNÉHO MANŽELSTVÍ. *Gynekolog* [online]. 2005, č. 2, s. 58-59 [cit. 2012-03-24]. ISSN 1210-1133. Dostupné z: <http://www.gyne.cz/clanky/2005/205cl1.htm>

[16]: DALE, B., TOSTI, E. a M. IACCARINO. Is the plasma membrane of the human oocyte reorganized following fertilization and early cleavage?. *Zygote*. New York, NY: Cambridge University Press, 1995, č. 3, s. 31-37. ISSN 0967-1994.

[17]: VEECK, L. L a ZANINOVIC, N. *An atlas of human blastocysts*. New York: Parthenon Pub. Group, 2003, 286 s. ISBN 9781842141694 (ALK. PAPER).

[18]: The World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: *Cambridge University Press*, 1992

[19]: AVERY, S. M.: Laboratory techniques: sperm preparation for assisted conception In: *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. 3rd ed. Abingdon, Oxon: Taylor, 2005, s. 203-209. ISBN 1842142933.

[20]: EDWARDS, R. G., FISHEL, S. G., COHEN, J. et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer*. 1984, č. 1, s. 3-23

[21]: AITKEN, R. J. Assessment of sperm function for IVF. *Human Reproduction*. 1988, č. 3, s.89-95

[22]: AITKEN, R. J., CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987, č. 81, s. 459-69

[23]: COHEN, J., EDWARDS, R. G. et al. In vitro fertilization: a treatment for male infertility. *Fertility and Sterility*. 1985, č. 43, s. 422-32

[24]: SAVASI, V., FERRAZZI, E., LANZANI, C. et al. Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Human reproduction* [online]. 2007, roč. 22, č. 3, s. 772-777 [cit. 2012-03-26]. ISSN 1460-2350. DOI: 10.1093/humrep/del422. Dostupné z: <http://www.humrep.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/del422>

[25]: GILLING-SMITH, C., EMILIANI, S., ALMEIDA, P. et al. Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Human reproduction* [online]. 2005, roč. 20, č. 6, 1433–1438 [cit. 2012-03-26]. ISSN 1460-2350. DOI: 10.1093/humrep/deh828. Dostupné z: <http://www.humrep.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/deh828>

[26]: ZAVOS, P. M. a WILSON, E. A. Retrograde ejaculation: etiology and treatment via the use of a new noninvasive method. *Fertility and Sterility*. 1984, roč. 42, č. 4, s. 627-632

[27]: ZAVOS, P. M. a WILSON, E. A. Retrograde ejaculation: A new technique for collection and reconstitution of retrograde ejaculate. *Infertility*. 1983, roč 5, č. 4, s. 287-296

[28]: KOFINAS, G. D. a ZAVOS, P. M. Retrograde ejaculation: preparation of spermatozoa for insemination from retrograde ejaculates using the new SpermPrep™ filtration method. *Molecular Andrology*. 1992, č. 4, s. 121-126

[29]: GIRGIS, S. M., ETRIBY, A., EL-HAFNAWY, H. et al. Aspermia: a survey of 49 cases. *Fertility and Sterility*. 1968, č. 19, s. 580-582

[30]: MAHADEVAN, M., LEETON, J. F., TROUSON, A. O. Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertility and Sterility*, 1981, č. 36, s. 243-7

[31]: HUGHES, E. The effectiveness of ovulation induction and intrauterine insemination in the treatment of persistent infertility: a meta-analysis. *Human Reproduction*. 1997, roč. 12, č. 9, s. 1865-1872. ISSN 14602350. DOI: 10.1093/humrep/12.9.1865. Dostupné z: <http://www.humrep.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/12.9.1865>

[32]: WALLACH, E. E. Gonadotropin treatment for the ovulatory patient--the pros and cons of empiric therapy for infertility. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], 1991, roč. 55, č. 3, s. 478-80. ISSN 0015-0282.

[33]: DODSON, W. C., WHITESIDES, D. B., HUGHES, C. L. et al. Superovulation with intrauterine insemination in the treatment of infertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], 1987, roč. 44, č. 3, s. 441-445. ISSN 0015-0282.

[34]: Intrauterinní inseminace. HULVERT, J. *ABC těhotenství* [online]. [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <http://www.abctehotenstvi.cz/txt/intrauterinni-inseminace>

[35]: Intrauterinní inseminace - IUI. *Lékaři.Online.CZ* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neploдности/zakroky/intrauterinni-inseminace-iui>

[36]: BRINDEN, P. R. a MARCUS. S. F. Intrauterine insemination. In: *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. 3rd ed. Abingdon, Oxon: Taylor, 2005, s. 257-265. ISBN 1842142933.

[37]: Artificial insemination for infertility, Intrauterine insemination - IUI. *Advanced Fertility Center of Chicago* [online]. © 1996–2012 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: <http://www.advancedfertility.com/insem.htm>

[38]: JAIRO E GARCIA, M. D. In Vitro Fertilization. *EMedicineHealth-experts for everyday emergencies* [online]. 8.10.2005 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: http://www.emedicinehealth.com/in_vitro_fertilization/article_em.htm

[39]: Mimotělní oplodnění (in vitro fertilizace – IVF). *Oplodnění.info* [online]. © 2008 - 2012 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.oplodneni.info/mimotelni-oplodneni/>

[40]: IVF - in vitro fertilizace. *Neploinnost.org* [online]. © 2007 - 2010 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.neploinnost.org/ivf.html>

[41]: Asistovaná reprodukce: metody umělého oplodnění. ŠEBLOVÁ, N. *Ordinace.cz* [online]. 15. ledna 2010 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.ordinace.cz/clanek/asistovana-reprodukce-metody-umeleho-oplodneni/>

[42]: Indukce ovulace. *EUROFERTIL.CZ: Reproductive medicine center* [online]. © 2010 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.eurofertil.cz/indukceovulace.php#stimulace>

[43]: IVF (in vitro fertilizace). *Klinikazdravi.cz: Vaše zdraví online* [online]. 15.11. 2011 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.klinikazdravi.cz/clanky/ivf-in-vitro-fertilizace/>

[44]: Mimotělní oplodnění - IVF. *LékařiOnline.cz* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/mimot%C4%9Bin%C3%AD-oplodneni-ivf>

[45]: In vitro fertilization : IVF. *Assisted reproductive technology: In vitro fertilization* [online]. Datum vydání neuveden [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: http://www.ivf-art.com/page_IVF.html

[46]: PTÁČEK, V. *Embryologie a reprodukce živočichů*. Učební text Přírodovědecké fakulty Masarikovy Univerzity. [online]. [cit. 2012-02-12]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/REPRODUKCE2.htm#vyvoj>

[47]: REICHMAN, D. E., JACKSON, K. V., RACOWSKY, C. Incidence and development of zygotes exhibiting abnormal pronuclear disposition after identification of two pronuclei at the fertilization check. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], May 2009, roč. 94, č. 3. 965-970

[48]: European Society for Human Reproduction and Embryology (2009, March 24). Single Embryo Transfer Is Cheapest And Most Effective Strategy For Assisted Reproduction, Studies Find. ScienceDaily. [cit. 2012-02-18]. Dostupné z: <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/03/090324200929.htm>

[49]: VAN STEIRTEGHEMA, A., DEVROEYA, P., LIEBAERSB, I. Intracytoplasmic sperm injection. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002, roč. 186, č. 2, s. 199–203

[50]: SHERMAN, J. a M. D. SILBER. ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection). *The infertility center of Saint Louis* [online]. 2011 [cit. 2012-02-08]. Dostupné z: <http://www.infertile.com/infertility-treatments/icsi.htm>

[51]: Intracytoplazmatická injekce spermie - ICSI. *Lékaři online* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-02-08]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/injekce-spermii-icsi>

[52]: MERCHANT, R., GANDHI, G, ALLAHBADIA, G. N. In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility. *Indian J Urol*. 2011, roč. 27, č. 1, s. 121-32

[53]: PICS. *Sanatorium Helios* [online]. © 2006–2011 [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: <http://www.sanatoriumhelios.cz/picsi>

[54]: New Sperm Selection technology for Assisted Reproductive Technology (ART) cleared by FDA. HORSHAM, P. A. *Biocoat. incorporated* [online]. 2006 [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: http://art.biocoat.com/news_071407.htm

[55]: PICS. *Next Generation Fertility* [online]. [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: <http://www.nextgenfertility.com.au/index.php/assisted-fertility/the-treatments/picsi>

[56]: ZETOVÁ a ŠULC. PICSI = preselected intracytoplasmatical sperm injection. *GEST*[online]. 11.10.2011 [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: <http://www.gest.cz/en/aktual.php>

[57]: PICSI. *GENNET: Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny* [online]. © 2010 [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: <http://www.gennet.cz/picsi.html>

[58]: GORDON BAKER, H. W. a De YI LIU. High frequency of defective sperm–zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Human Reproduction* [online]. 2004, roč. 19, č. 2, s. 228-233 [cit. 2012-02-25]. DOI: 10.1093. Dostupné z: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/19/2/228.long>

[59]: GONZÁLEZ-ORTEGA, C. et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) vs intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in patients with repeated ICSI failure. *Ginecología y obstetricia de México*. 2010, roč. 78, č. 12, s. 652-9. ISSN 0300-9041.

[60]: What is IMSI (Intra-Cytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection)?. *UKHealthCentre* [online]. © 2011 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.healthcentre.org.uk/fertility-treatment/imsi.html>

[61]: IMSI — Intra-cytoplasmic morphologically selected sperm injection. *Cambridge IVF: Creating your future* [online]. 2012 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.cambridgeivf.org.uk/treatments/treatments-imsi.html>

[62]: ANTINORI, Monica, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2008, roč. 16, č. 6, s. 835-841 [cit. 2012-02-25]. Dostupné z: <http://www.mensfe.net/antinori.pdf>

[63]: BARTOOV, B., A. BERKOVITZ a F. ELTES, et al. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *Journal of Andrology*. 2002, roč. 23, 1–8.

[64]: BARTOOV, B., A. BERKOVITZ a F. ELTES, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertility and Sterility*. 2003, roč. 80, s. 1413–1419.

[65]: KNEZ, K, ZORN, B., TOMAZEVIĆ, T. et al. The IMSI procedure improves poor embryo development in the same infertile couples with poor semen quality: A comparative prospective randomized study. *Reproductive Biology and Endocrinology*[online]. 2011, roč. 9, č. 1, s. 123- [cit. 2012-02-25]. ISSN 1477-7827. DOI: 10.1186/1477-7827-9-123. Dostupné z: <http://www.rbej.com/content/9/1/123>

[66]: Asistovaný hatching. *LékařiOnline.cz* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/asistovany-hatching>

[67]: BENTLEY, Gillian R a C MASCIE-TAYLOR. *Infertility in the modern world: present and future prospects*. New York: Cambridge University Press, 2000, 264 s. ISBN 05-216-4364-3.

[68]: HAMMADEH, Mohamad Eid, Constanze FISCHER-HAMMADEH a Khaled Refaat ALI. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011, roč. 28, č. 2, s. 119-128. ISSN 1058-0468. DOI: 10.1007/s10815-010-9495-3. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10815-010-9495-3>

[69]: COHEN J. et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Human Reproduction*. 1990, roč. 5, č. 1., 7-13

[70]: ESTEVES, S. C., R. MIYAOKA a A. AGARWAL. SPERM RETRIEVAL TECHNIQUES FOR ASSISTED REPRODUCTION. *International Braz J Urol* [online]. 2011, roč. 37, č. 5, s. 570-583 [cit. 2012-03-27]. Dostupné z: http://www.brazjurol.com.br/september_october_2011/Esteves_570_583.htm

[71]: ESTEVES, S C., MIYAOKA, R. a AGARWAL, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *International Braz J Urol* [online]. 2011, roč. 37, č. 5, s. 570-583 [cit. 2012-03-27]. DOI: 10.1590/S1807-59322011000400026. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext

[72]: MENIRU, G. I. *Cambridge guide to infertility management and assisted reproduction*. New York: Cambridge University Press, 2001, 276 s. ISBN 05-210-1071-3.

[73]: MENIRU, G. Studies of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction Update* [online]. 1998-01-01, roč. 4, č. 1, s. 57-71 [cit. 2012-03-28]. ISSN 1355-4786. DOI: 10.1093/humupd/4.1.57. Dostupné z:

<http://humupd.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/4.1.57>

[74]: GORGY, A., MENIRU, G. I., NAUMANN, N. et al. An evaluation of the efficacy of local anaesthesia for percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and testicular sperm aspiration (TESA). *Assist. Reprod. Genet.* 1997a, č. 14, s. 103

[75]: TEMPLE-SMITH, P. D., SOUTHWIC, G. J., YATES, C. A. et al. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1985, č. 2, s. 119-22.

[76]: Chirurgický odběr spermií MESA, TESE. *LékařiOnline.CZ* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-03-28]. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/odber-spermii>

[77]: Devroey, P., Liu, J., Nagy, Z., et al.: Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction.* 1995, č. 10, s. 1457-60.

[78]: SCHLEGEL, P. N. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Human Reproduction.* 1999, č. 14, s. 131-5.

[79]: PTÁČEK, Radek a Petr BARTŮŇK. *Etika a komunikace v medicíně*. Praha: Grada, 2011, 528 s. Edice celoživotního vzdělávání ČLK. ISBN 978-802-4739-762.

[80]: VESELÝ, J. a K. VESELÁ. Preimplantační genetická diagnostika - PGD. *Fórum zdraví* [online]. 04.11.2008 [cit. 2012-03-28]. Dostupné z: <http://www.forumzdravi.cz/clanek-134-preimplantacni-geneticka-diagnostika-pgd>

[81]: PGD: Preimplantační genetická diagnostika. *PRONATAL* [online]. 1994-2008 [cit. 2012-03-28]. Dostupné z: <http://www.pronatal.cz/pages/pece-pgd-asistovana-reprodukce.php>

[82]: Genetické poradenství. *Genetika - Biologie: Váš zdroj informací o genetice a biologii* [online]. ©2010-2012 [cit. 2012-03-28]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/geneticke-poradenstvi>

[83]: DI SANTO, Marlea, Nicoletta TAROZZI, Marco NADALINI a Andrea BORINI. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*. 2012, roč. 2012, s. 1-12. ISSN 1687-6369. DOI: 10.1155/2012/854837. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/au/2012/854837/>

[84]: Kryokonzervace. *LékařiOnline.CZ* [online]. © 2006 - 2012 [cit. 2012-02-17]. ISSN 1802-1751 0.04. Dostupné z: <http://www.lekari-online.cz/lecba-neplodnosti/zakroky/kryokonzervace>

[85]: MANDELBAUM, Jacqueline, Joëlle BELAÏSCH-ALLART, Anne-Marie JUNCA, Jean-Marie ANTOINE, Michelle PLACHOT, Sylvia ALVAREZ, Marie-Odile ALNOT a Jacques SALAT-BAROUX. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Human Reproduction* [online]. 1998, roč. 13, č. 3, s. - [cit. 2012-02-17]. DOI: 10.1093/humrep/13.suppl_3.ix. Dostupné z: http://humrep.oxfordjournals.org/content/13/suppl_3/161.full.pdf+html?sid=1d5bb716-3b73-41dc-bbd4-578ec7d95f06

[86]: Zmrazení ovariální tkáně může obnovit plodnost u žen po chemoterapii. *Zdravotnické noviny: ZDN* [online]. 4.5.2001, roč. 18 [cit. 2012-02-17]. ISSN 1214-7664. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/zmrazeni-ovarialni-tkane-muze-obnovit-plodnost-u-zen-po-chemoter-135397>

[87]: ŘEŽÁBEK, Karel. Kryokonzervace spermií a embryí. *Postgraduální medicína* [online]. 30.8.2000, č. 4 [cit. 2012-02-17]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/kryokonzervace-spermii-a-embryi-134352>

[88]: BEHRMAN, S. J. a Y. SAWADA. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], 1966, roč. 17, č. 4. ISSN 0015-0282.

[89]: THACHIL, J. V. a M. A. S. JEWETT. Preservation techniques for human semen. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society

for Reproductive Medicine [etc.], 1981, roč. 35, č. 5, s. 546–548. ISSN 0015-0282.

[90]: HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* [online]. 2000, roč. 62, č. 1, s. 3–22 [cit. 2012-02-17]. Dostupné z: [http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320\(00\)00152-4/fulltext](http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/anirep/article/S0378-4320(00)00152-4/fulltext)

[91]: SHERMAN, J. Cryopreservation of human semen. In: KEEL, Brooks A. *CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1990. ISBN 0849335493.

[92]: LASSALLE, B., J. TESTART a J.P. RENARD. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertility and sterility*. Birmingham, Ala. [etc.]: American Society for Reproductive Medicine [etc.], 1985, roč. 44, s. 645-651. ISSN 0015-0282.

[93]: COHEN, J., R.F. SIMONS a R.G. EDWARDS et al. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *In Vitro Fertil. Embryo Transfer*. 1985, roč. 2, s. 59-64

[94]: SHER, Geoffrey. Egg and embryo freezing: Vitrification is a giant leap. *IVF Authority* [online]. 2009 [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: <http://www.ivfauthority.com/2009/06/egg-and-embryo-freezing-vitrification.html>

11. Seznam příloh

Příloha 1: Spodní referenční limity vyšetřovaných parametrů charakterizujících ejakulát

Parametr	Dolní referenční limit
Objem ejakulátu (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Celkový počet spermií (mil na množství ejakulátu)	39 (33-46)
Koncentrace spermií (mil na ml ejakulátu)	15 (12-16)
Celková pohyblivost (PR + NP, %)	40 (38-42)
Progresivní pohyblivost (PR, %)	32 (31-34)
Vitalita (živé spermie, %)	58 (55-63)
Morfologie spermií (normální formy, %)	4 (3,0-4,0)
Další dohodnuté limity parametrů	
pH	≥7,2
Peroxidáza-pozitivní leukocyty (mil na ml ejakulát)	≤1,0
MAR test (pohyblivé spermie s vazenými částicemi, %)	<50
Immunobead test (pohyblivé spermie s bound beat, %)	<50
Seminální zinek (μmol/ejakulát)	≥2,4
Seminální fruktóza (μmol/ejakulát)	≥13
Seminální neutrální glukosidáza (mU/ejakulát)	≥20

Zdroj: *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization, c2010, 271 s. ISBN 92-415-4778-2.

Příloha 2: Technika založená na přímém vycestování spermii (Direct swim-up)



Zdroj:

http://www.origio.com/download%20center/quality%20and%20regulatory%20documents/instructions%20for%20use/~media/files_to_download/IFU/0800/IFU%20%20Sperm%20Prep_tyrkisk-tjekkisk%200826-02.ashx [online: 6.2.2012]

Příloha 3: Hormonální preparáty nejběžněji užívané při IUI

Table 3 Commonly used superovulation drugs for intrauterine insemination

<i>Agent</i>	<i>Trade name</i>	<i>Company</i>	<i>Route of administration</i>
<i>Antiestrogens</i>			
Clomiphene citrate	Clomid	Merrell	oral
	Serophene	Serono	oral
Tamoxifen	Nolvadex	Zeneca	oral
<i>Gonadotropins</i>			
Highly purified follicle stimulating hormone	Metrodin HP	Serono	SC/IM
	Orgafol	Organon	SC/IM
Recombinant follicle stimulating hormone	Gonal-F	Serono	SC
	Puregon	Organon	SC
Human chorionic gonadotropin	Profasi	Serono	SC/IM
	Pregnyl	Organon	IM
<i>Gonadotropin releasing hormone agonists</i>			
Buserelin	Suprefact	Shire	nasal/SC
	Suprecur	Shire	nasal/SC
Nafarelin	Synarel	Searle	nasal

Zdroj: BRINDEN, P. R. *Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. 3rd ed. Abingdon, Oxon: Taylor, 2005, s. 257-265. ISBN 1842142933